



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**BIOMARCADORES SALIVARES PARA DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS SISTÊMICAS E PSICOEMOCIONAIS**

Trabalho submetido por  
**Kapila Gomes Mósca**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**setembro de 2020**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**BIOMARCADORES SALIVARES PARA DIAGNÓSTICO DE  
DOENÇAS SISTÉMICAS E PSICOEMOCIONAIS**

Trabalho submetido por  
**Kapila Gomes Mósca**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutora Alexandra Figueiredo**

e coorientado por  
**Prof. Doutor Paulo João Bela Teiga de Durão Maurício**

**setembro de 2020**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Vivian e Vinícius, meus avós Valter e Edi, meu esposo Rafael e meus filhos Júlia, Valentina, Manuella e Pedro que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos.

Obrigada por serem meu maior incentivo e luz em minha vida! Amo vocês.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus orientadores, Prof. Doutora Alexandra Figueiredo e Prof. Doutor Paulo João Bela Teiga de Durão Maurício por toda paciência, orientação e empenho, meu mais sincero agradecimento.

À Deus, aquele que sempre permitiu que todas as coisas se concretizassem na minha vida, e que em tempos difíceis foi meu grande amparo e consolador.

A todas as pessoas que contribuíram para a construção dos meus valores: meus pais, meus avós, meus professores do passado e todos os que compartilharam um pouco do seu conhecimento comigo.

Não vou deixar de agradecer a compreensão e apoio de pessoas especiais e fundamentais, quando minha presença não foi possível e quando minha preocupação e atenção pareciam se voltar exclusivamente para esta etapa da minha vida, obrigada Rafael, meu amor, por ser a base da minha vida, Jú, Valen, Manu e Pedro, razão da minha vida, por toda a compreensão, incentivo, e força, sem vocês nada disso teria sido possível, obrigada Mãe e Pai, Vó e Vô, por sempre acreditarem em mim e me ajudarem a realizar meus sonhos.

E por fim, aos meus queridos colegas e hoje amigos que fizeram parte desta difícil caminhada e entendem toda a persistência, dificuldade e fé que nos acompanhou desde o princípio até a conclusão desta etapa.





## RESUMO

Diversas patologias têm um início silencioso, levando a um diagnóstico difícil e, na maioria das vezes tardio devido à inexistência de sintomas. Patologias com um enorme impacto universal, como as neoplásicas, metabólicas, cardiovasculares e neurológicas carecem de um método alternativo ao praticado, sendo importante criar um método de diagnóstico mais precoce. Este diagnóstico possibilitaria o aumento da resposta ao tratamento, diminuição de impactos graves na vida do paciente, e, deste modo, um aumento da taxa de sobrevivência.

Como forma de diagnóstico precoce, a recolha salivar possui uma variedade de vantagens quando comparadas com a recolha de sangue, urina ou material naso e orofaríngeo através de um esfregaço com *Swabs*, ou seja, um cotonete utilizado para recolha de secreções da porção posterior do nariz e garganta. A saliva aparece como um instrumento de diagnóstico, possuindo a vantagem de ser recolhida facilmente e de forma não invasiva, diminuindo o desconforto quando comparada com recolha de sangue, bem como melhoria em termos de privacidade quando comparada a recolha de urina. Tratando-se de doenças infecto-contagiosas, como o Covid-19, a saliva pode ser recolhida pelo próprio paciente, evitando exposição de profissionais de saúde ao vírus e minimizando o risco de infeções cruzadas.

Além da simplicidade de recolha, armazenamento e transporte, apresenta custo baixo, permitindo testes generalizados, podendo ser utilizada em larga escala ou estudos epidemiológicos principalmente em crianças por ser um método de recolha fácil e indolor. A obtenção de amostras contínuas para a monitorização no decorrer do tempo é simplificada, oferecendo segurança para os Médicos Dentistas e outros profissionais de saúde no manuseio e diagnóstico.

**Palavras-chave:** Saliva. Biomarcadores. Patologias sistêmicas. Patologias psicoemocionais



## **ABSTRAT**

Several pathologies have a silent onset, leading to a difficult diagnosis and, in most cases, late due to the absence of symptoms. Pathologies with an enormous universal impact, such as neoplastic, metabolic, cardiovascular and neurological diseases, lack an alternative method to the one practiced, and it is important to create an earlier diagnostic method. This diagnosis would make it possible to increase the response to treatment, decrease the serious impacts on the patient's life, and thus increase the survival rate.

As a form of early diagnosis, salivary collection has a variety of advantages when compared to the collection of blood, urine or naso and oropharyngeal material through a swab smear, that is, a cotton swab used to collect secretions from the back of the nose. and throat. Saliva appears as a diagnostic tool, having the advantage of being collected easily and in a non-invasive manner, reducing discomfort when compared to blood collection, as well as an improvement in privacy when compared to urine collection. In the case of infectious diseases, such as Covid-19, saliva can be collected by the patient himself, avoiding exposure of health professionals to the virus and minimizing the risk of cross-infection.

In addition to the simplicity of collection, storage and transport, it has a low cost, allowing generalized tests, and it can be used on a large scale or epidemiological studies mainly in children as it is an easy and painless collection method. Obtaining continuous samples for monitoring over time is simplified, offering security for dentists and other health professionals in handling and diagnosis.

**Key-words:** Saliva. Biomarkers. Systemic pathologies. Psychoemotional pathologies.



# ÍNDICE GERAL

I.	INTRODUÇÃO .....	13
II.	DESENVOLVIMENTO .....	15
1.	Biomarcadores .....	15
1.1	Urina.....	17
1.2	Líquido cefalorraquidiano .....	18
1.3	Sangue .....	19
1.4	Saliva .....	20
2.	Alvos moleculares de diagnóstico na saliva .....	29
2.1	Caracterização da saliva .....	35
3.	Saliva como meio de diagnóstico.....	36
3.1	Patologias Sistêmicas.....	36
3.2	Patologias Psicoemocionais .....	40
3.3	Vantagens da utilização da saliva como meio de diagnóstico.....	42
3.4	Desvantagens da utilização da saliva como meio diagnóstico .....	43
3.5	Limitações.....	44
III.	CONCLUSÃO .....	45
IV.	BIBLIOGRAFIA .....	47



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Localização e estrutura das glândulas salivares..	21
<b>Figura 2</b> - Mecanismo de transporte .....	22
<b>Figura 3</b> - Resumo da composição, propriedades e fisiologia da saliva .....	23
<b>Figura 4</b> - Origem dos fluídos e biomoléculas que constituem a saliva .....	23
<b>Figura 5</b> - Métodos de recolha de saliva. ....	26
<b>Figura 6</b> - Métodos de recolha de saliva de glândula específica.....	26
<b>Figura 7</b> - Material necessário para a recolha de saliva. ....	28
<b>Figura 8</b> - Electroforetograma em gel 2D de proteínas da saliva total humana.....	31
<b>Figura 9</b> - Utilização de saliva em Covid-19. ....	33





## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Biomarcadores de tumores. (Adaptado de Oncoguia, 2020). .....	16
<b>Tabela 2</b> - Diferentes classes de marcadores identificados na saliva e as suas aplicações possíveis. (Adaptado de Segal & Wong, 2008).....	30



## LISTA DE ABREVIATURAS

**AAS** - Atividade de  $\alpha$ -amilase salivar

**CMR** – *Cardio metabolic risk* (risco cardiometabólico)

**Covid-19** – Doença por coronavírus

**CT** - Capacidade tampão

**CV** – Cardiovascular

**DHEA** - Dehidroepiandrosterona

**DNA** - *Desoxyribonucleic acid* (ADN - ácido desoxirribonucleico)

**ENE** - Enzima enolase neurônio-específica

**EP** - Stress percebido

**FSE** - Fluxo salivar estimulado

**FSNE** - Fluxo salivar não-estimulado

**FTIR** – *Infrared spectrometry with Fourier transform* (espectrometria Infravermelha com transformada de Fourier)

**GCF** - *Crevicular gingival fluid* (fluido gengival crevicular)

**HIV** – *Human immunodeficiency virus* (vírus da imunodeficiência humana)

**HPA** – *Hypothalamic-pituitary-adrenal axis* (eixo hipotálamo-pituitário-adrenal)

**HSP** - *Human salivary proteome* (proteoma salivar humano)

**IgA** - Imunoglobulina A

**LCR** - Líquido cefalorraquidiano

**LDH** – Lactato desidrogenase

**MDD** – *Major depressive disorder* (transtorno depressivo maior)

**MS** – *Mass spectrometry* (espectrometria de massa)

**NIDCR** – *National Institute of Dental and Craniofacial Research* (Instituto Nacional de Pesquisa Odontológica e Craniofacial)

**PCR rRT** – *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction in real time* (reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcrição reversa em tempo real)

**RNA**- *Ribonucleic acid* (ácido ribonucleico)

**SAM** - *Sympathetic-adrenal axis* (eixo simpático-adrenal)

**SNC** - Sistema nervoso central

**SNS** - Sistema nervoso simpático

**SARS-CoV-2** - *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2* (síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2)

**usRCP** – *Ultra-sensitive reactive C protein* (proteína C reativa ultrasensível)

## I. INTRODUÇÃO

O interesse em fluídos biológicos menos invasivos, para substituição da recolha de sangue, tem aumentado nos últimos anos. A procura e identificação de biomarcadores nos fluídos corporais que indiquem o estado de saúde de um indivíduo, é importante para que seja possível efetuar um diagnóstico precoce de diversas patologias na sua fase inicial (Javaid et al., 2016; Zhang et al., 2013).

A saliva é um fluído hipotónico em relação ao plasma. Contém compostos produzidos localmente nas glândulas salivares (imunoglobulina A [IgA] e  $\alpha$ -amilase), e também compostos disseminados do plasma (água, eletrólitos, proteínas, metabólitos e hormonas). Esta desempenha funções importantes na proteção da mucosa oral contra microrganismos e na digestão dos alimentos. A sua produção e composição dependem da atividade do sistema nervoso autónomo simpático e parassimpático, cuja ação antagónica pode resultar em diferentes volumes de saliva, com perfis proteico e iónico distintos (Malathi et al., 2014; Nunes & Macedo, 2013).

Em condições de saúde é esperado um equilíbrio de oxidação. O excesso de oxidantes pode causar danos no organismo por não existir proteção contra os efeitos nocivos dos mesmos. O envelhecimento, patologias cardiovasculares, artrite reumatoide, neoplasias, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, entre outras, são exemplos de processos biológicos que podem estar associados ao stress oxidativo, e por sua vez, ao seu desequilíbrio (Pham-Huy et al., 2008).

A saliva é produzida e secretada na cavidade oral pelas glândulas salivares e apresenta-se como uma solução aquosa transparente que contém um conjunto de substâncias, principalmente proteínas e glicoproteínas (Dawes et al., 2015). Assim sendo, apresenta um grande potencial como biomarcador para a deteção de doenças orais e sistémicas (Buczko et al., 2015).

Quando a relação entre biomarcadores de saliva e certas patologias é confirmada, facilita a determinação da doença. Esta medida torna-se primordial para a redução da severidade da patologia e para a prevenção de complicações que podem reduzir o bem-estar do doente, contribuído ainda para o aumento da taxa de sucesso do tratamento (Javaid et al., 2016).

Estudos demonstraram um grande potencial na saliva de monitorizar alterações corporais, como distúrbios metabólicos, anemias, marcadores de ácido desoxirribonucleico (DNA), controle de doping e, principalmente, monitorizar alterações fisiológicas em atletas resultantes do treino físico (Caetano et al., 2015; Miricescu et al., 2011).

O diagnóstico através de biomarcadores de saliva engloba várias áreas como a monitorização de fármacos, a medicina personalizada e a forense, detecção de entorpecentes, entre outros. Destaca-se também, a sua importância no diagnóstico das mais variadas patologias sistêmicas e psicossociais (Malamud, 2011).

Um diagnóstico preciso e precoce é essencial para que haja um tratamento da patologia em causa. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo descrever os diversos biomarcadores salivares para o auxílio no diagnóstico de patologias sistêmicas e psicoemocionais.

No presente trabalho foram analisados artigos pesquisados nas bases de dados Google Acadêmico, Scielo, PubMed e Lilacs, utilizando as palavras chaves: “Saliva”, “Biomarcadores”, “Patologias sistêmicas”, “Patologias psicoemocionais”. Foram selecionados 83 estudos em humanos, considerando o período de 1999 a 2020. Não houve restrição quanto ao tipo de estudo e linguagem. Foram excluídos os artigos que não se mencionavam o tema em questão.

## **II. DESENVOLVIMENTO**

### **1. Biomarcadores**

A definição de um biomarcador atribui-se a uma medida farmacológica ou fisiológica que pode ser usada para prever um evento tóxico. Neste caso, uma molécula que contém um material específico, pode ser usado para diagnosticar uma patologia ou medir a progressão e o resultado de um determinado tratamento. As características dos biomarcadores torna-os adequados como um meio complementar de diagnóstico, podendo contribuir de forma eficaz no diagnóstico final com outros meios (Brinkman & Wong, 2006).

A presença de determinados biomarcadores pode estar intimamente relacionada com o estado de saúde de um indivíduo, ou seja, quando o estado de saúde é afetado os biomarcadores sinalizam o problema e indicam a patologia em causa (Liu & Duan, 2012).

Existe uma enorme variedade de biomarcadores, (microrganismos, anticorpos, lípidos, proteínas, RNA, DNA, etc.). As modificações na estrutura, na concentração, função ou ação dos biomarcadores podem estar associadas ao desenvolvimento de um distúrbio em particular, ou dar uma indicação da resposta do organismo humano a um determinado tratamento. A avaliação e compreensão do significado da expressão de biomarcadores de um determinado parâmetro na saúde de um indivíduo pode ter uma enorme utilidade na determinação da presença, localização e até prognóstico de uma determinada patologia (Pereira de Lima et al., 2020). Deste modo, os biomarcadores apresentam-se como um método valioso e muito importante na deteção, avaliação do risco, prognóstico, diagnóstico, e monitorização da patologia (Yoshizawa et al., 2013).

Os biomarcadores podem ser encontrados na urina, no líquido cefalorraquidiano, no sangue e na saliva, podendo auxiliar os médicos em intervenções precoces, evitando que as patologias em causa evoluam para quadros graves. Inúmeras doenças neoplásicas são diagnosticadas através de biomarcadores encontrados nos fluidos corporais do organismo, dentre eles, sangue, urina, saliva e fluído cerebrospinal como mostra a tabela 1.

**Tabela 1** - Biomarcadores de tumores. (Adaptado de Oncoguia, 2020).

AFP Alfa-fetoproteína	Cancro de fígado Tumores de células germinativas	Sangue
Assinatura de 5 proteínas	Cancro de ovário	Sangue
B2M Beta-2-microglobulina	Mieloma múltiplo, leucemia linfóide crônica e alguns linfomas	Sangue Urina Líquido cefalorraquidiano
Beta-hCG Gonadotrofina coriônica humana beta	Coriocarcinoma Tumores de células germinativas	Urina Sangue
BRCA1 e BRCA2 mutações nos genes	Cancro de ovário Cancro de mama	Sangue Tumor
BTA Antígeno tumoral da bexiga	Cancro de bexiga Cancro rim ou ureter	Urina
VMA e HVA Catecolaminas na urina	Neuroblastoma	Urina
CEA Antígeno carcinoembrionário	Cancro colorretal e alguns outros tipos de cancro	Sangue
Células tumorais circulantes de origem epitelial	Cancro de mama avançado Cancro de próstata Cancro colorretal	Sangue
CA15-3/CA27.29	Cancro de mama	Sangue
CA19-9	Cancro de pâncreas, vesícula biliar, ducto biliar e gástrico	Sangue
CA-125	Cancro de ovário	Sangue
CA 27-29	Cancro de mama	Sangue
Calcitonina	Cancro medular da tireoide	Sangue
CD20	Linfoma não-Hodgkin	Sangue
CD22	Leucemia de células pilosas Neoplasias de células B	Sangue Medula óssea
CD25	Linfoma não-Hodgkin (célula T)	Sangue
CD33	Leucemia mieloide aguda	Sangue
CgA	Tumores neuroendócrinos	Sangue
Cromossomos 3, 7, 17 e 9p21	Cancro de bexiga	Urina
DCP Des-gama-carboxi-protrombina)	Carcinoma hepatocelular	Sangue
LDH Desidrogenase láctica	Tumores de células germinativas Linfoma Leucemia Melanoma Neuroblastoma	Sangue
DPD Mutação no gene	Cancro de mama Cancro colorretal Cancro de estômago Cancro de pâncreas	Sangue
NSE	Cancro de pulmão de pequenas células e neuroblastoma	Sangue
Exclusão do cromossomo 17p	Leucemia linfocítica crônica	Sangue
Fibrina/Fibrinogênio	Cancro de bexiga	Urina
Imunoglobulinas	Mieloma múltiplo	Sangue



## 1.1 Urina

A urina é um fluido de fácil acesso e o seu perfil biomolecular demonstra ter bons resultados na identificação de biomarcadores específicos (Pieper et al., 2004). Em particular, a quantidade de biomarcadores de neoplasias por meio da urina representa uma opção para a deteção prematura e para o monitorização da patologia, uma vez que os compostos libertados pelas células cancerígenas enriquecidas podem ser detetados neste fluido corporal (Alberice, 2014; Orenes-Piñero et al., 2007).

A urina é rica em biomoléculas do trato urinário e rins, tornando-a um fluido ideal para estudar estes órgãos. Proteómica refere-se à investigação em grande quantidade de proteínas, avaliando a sua organização e função, em várias amostras biológicas, células, órgãos ou organismos. As proteínas são os efetores críticos das funções e dos fenótipos celulares, pois podem reter melhor o estado funcional e as propriedades dinâmicas de uma célula. O processamento e a análise de dados proteómicos são processos complexos, mas podem resultar na descoberta de novos biomarcadores de doenças para aplicações clínicas e diagnósticas (Decramer et al., 2008; Kaczor-Urbanowicz & Wong, 2019).

Em comparação com outros fluidos corporais, a urina tem a vantagem de ser não invasiva e de fácil acesso, o que permite obter várias amostras de um indivíduo para avaliação de reprodutibilidade, e, ainda pelo facto de as biomoléculas presentes na urina, serem hidrossolúveis (Decramer et al., 2008; Pejcic et al., 2010).

Como desvantagens, destaca-se o facto a ingestão de líquidos e alterações na dieta, o ritmo cardíaco, exercícios e nível circulatório, alterarem as concentrações dos biomarcadores urinários. Neste caso, são necessárias etapas adicionais para aumentar a sua concentração, levando à perda de proteínas. A abundância de proteínas como albumina, pode mascarar outras proteínas, sendo necessária uma etapa de depleção que deverá ser realizada. O alto conteúdo de sal, também é uma desvantagem, pois é incompatível com algumas das técnicas analíticas (Alberice, 2014).

## **1.2 Líquido cefalorraquidiano**

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluído biológico também denominado de fluído cerebrospinal ou líquor. É constituído por um filtrado dos plexos coróides, estando intimamente relacionado com o sistema nervoso central (SNC) e os seus invólucros (meninges). Está localizado na zona subaracnoídea e nos ventrículos do cérebro. A sua análise é importante para deteção de doenças ou alterações a nível neurológico (Ramont et al., 2005).

Num indivíduo saudável, o LCR apresenta altas concentrações de cloreto de sódio, e baixas concentrações de outros constituintes, tais como: glicose, lactato, proteínas, magnésio, potássio, proteínas. Apresenta também na sua composição, células inferiores a cinco milímetros cúbicos, possuindo um aspeto de “água de rocha”, límpido e descolorado (Rosato et al., 2006). Perante uma situação patológica, há um aumento do número de células e de bactérias/fungos, criando assim um aspeto turvo (Dimas & Puccioni-Sohler, 2008).

Alguns dos biomarcadores mais relevantes neste fluído são: proteína tau, o peptídeo A $\beta$ 1-42 e a enzima enolase neurónio-específica (ENE). A proteína tau tem a função de estabilizar os microtúbulos e de conservar as proximidades entre os neurónios com a sua estrutura axonal. No caso do peptídeo A $\beta$ 1-42 este advém de uma proteína precursora amilóide pela segmentação da mesma por enzimas denominadas secretases. Estes analitos estão envolvidos em condições patológicas de doenças neurodegenerativas como o caso da doença de Alzheimer. É importante analisar os níveis desta proteína para poder detetar antecipadamente as doenças (Schoonenboom et al., 2005). A ENE é uma enzima dimérica composta de subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  e suas isoformas são sintetizadas por neurónios e tecido neuroendócrino. As isoformas  $\alpha$  e  $\gamma$  são abundantes em eritrócitos, por isso são também utilizadas como biomarcadores de certos cancros e, mais recentemente, de doenças neurodegenerativas (Ramont et al., 2005).

### 1.3 Sangue

A obtenção de amostras de sangue é o método de análise escolhido para a detecção de biomarcadores devido ao seu fácil acesso, a constante renovação e interações exclusivas com todos os outros tecidos no corpo (Cacabelos, 2009; Decourt & Sabbagh, 2011).

Para sua utilização na análise bioquímica, o sangue é normalmente fracionado em plasma, soro, glóbulos vermelhos, plaquetas e células mononucleares do sangue periférico, tornando os biomarcadores plasmáticos/séricos especialmente interessantes para a prática clínica e pesquisa (Cacabelos, 2009). As frações sanguíneas, soro e plasma, encontram-se entre as fontes mais importantes de marcadores biológicos, fornecendo informações bastante ricas sobre processos fisiológicos e patológicos (Omenn et al., 2005). A avaliação do sangue para fins de diagnóstico é bem conhecida e as duas frações são similares em composição. Contudo, o plasma apresenta-se mais estável que o soro e mais adequado para análise de proteínas de baixo peso molecular. No entanto, o soro é o material de escolha para diversos testes, pois os anticoagulantes do plasma produzem alterações em alguns métodos utilizados (Huijbers et al., 2010).

Apenas 22 proteínas constituem mais de 95% do proteoma do soro/plasma, como a albumina, haptoglobina, transferrina, lipoproteínas e imunoglobulinas (Surinova et al., 2011).

As amostras devem ser mantidas estáveis a 2-8°C até cinco dias, podendo manter-se durante mais tempo se forem congeladas. É recomendado que as amostras sejam transportadas, refrigeradas e congeladas posteriormente, evitando ciclos de congelamento-descongelamento (Melo et al., 2010).

O sangue ou plasma é o fluido corporal mais utilizado e mais conhecido como meio de diagnóstico e obtenção de biomarcadores. Contudo, na maioria dos casos, os procedimentos de recolha de sangue podem ter desvantagens a nível económico e é considerado traumático para alguns pacientes (Yoshizawa et al., 2013; Zheng et al., 2014).

#### **1.4 Saliva**

A saliva humana encontra-se na cavidade oral, sendo um fluido de fácil acesso composto por uma junção de produtos secretórios, podendo ser orgânicos e inorgânicos. Estes provêm da excreção das glândulas salivares maiores e menores e de outras substâncias provenientes da mucosa da orofaringe, vias aéreas superiores, refluxo gastrintestinal, fluido do sulco gengival, restos alimentares e componentes derivados do sangue, sendo fundamental para a manutenção da saúde oral (Lima et al., 2014a; Liu & Duan, 2012; Patel & Barros, 2015).

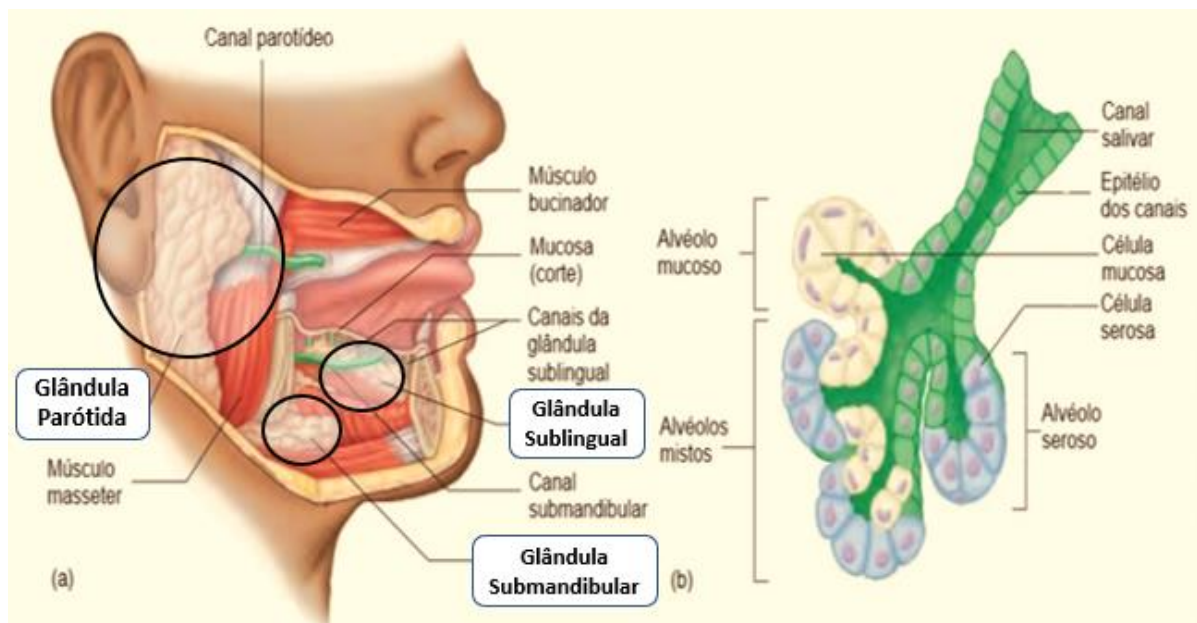
A saliva é chamada de “espelho do corpo” ou “janela do estado de saúde” por ser considerada um filtrado do sangue e porque determinadas condições patológicas alteram os seus constituintes (Rapado-González et al., 2016).

A composição salivar pode variar conforme as alterações no seu fluxo salivar e nos diversos estímulos externos (Dawes et al., 2015). A saliva é um biofluido oral, cujo pH encontra-se entre 6,5 a 7. É constituída na maior parte por água (98%), e por eletrólitos, muco, compostos antibacterianos e diversas enzimas (2%) (Liu & Duan, 2012; Rathnayake et al., 2017). Os componentes inorgânicos mais prevalentes incluem: sódio, potássio, cálcio, magnésio, cloreto e carbonatos, enquanto os componentes orgânicos compreendem amilases, peroxidases, lipases, mucinas, lisozimas, lactoferrinas, calicreínas, cistatinas, hormonas e fatores de crescimento (Chiappin et al., 2007). Para um indivíduo saudável, estima-se que a secreção salivar diária se encontre no intervalo de 0,5 e 1,5 L (Mese & Matsuo, 2007).

A produção e composição da saliva dependem da atividade do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, cuja ação antagônica pode resultar em diferentes volumes com perfis proteicos e iônicos distintos. A saliva é filtrada e processada na cavidade oral pelos vasos vasculares que nutrem as glândulas salivares (Nunes & Macedo, 2013).

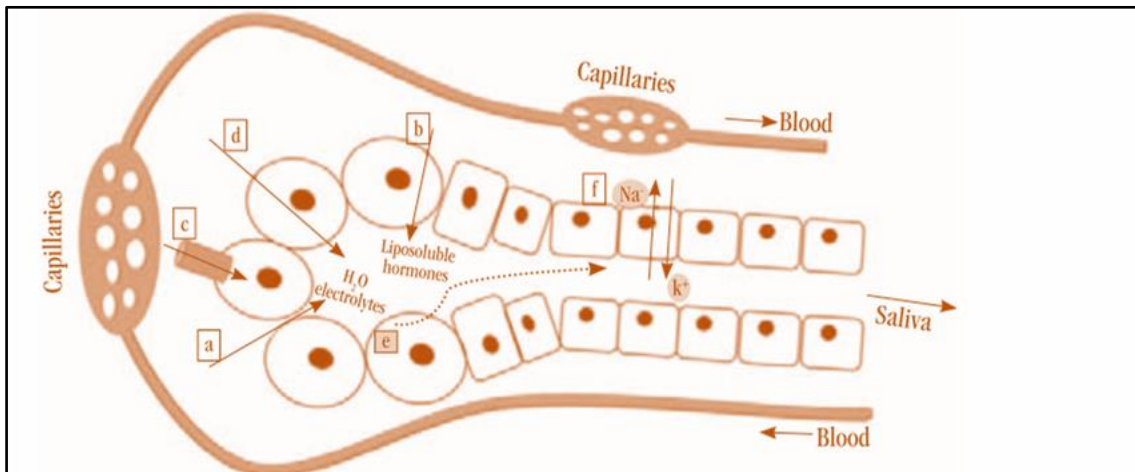
O fluido oral origina-se maioritariamente a partir das principais glândulas salivares (parótida, sublingual e submandibular) e também glândulas salivares menores. Relativamente às glândulas parótidas, são serosas e sua secreção carece de

mucina. Quanto às glândulas submandibular e sublingual, estas são mistas, tendo secreção serosa e mucosa. As glândulas salivares menores que estão situadas no tecido conjuntivo abaixo das papilas circunvaladas são as glândulas de Von Ebner, e as mucosas são as glândulas de Blandin-Nühm (Figura 1) (Carranza et al., 2005).



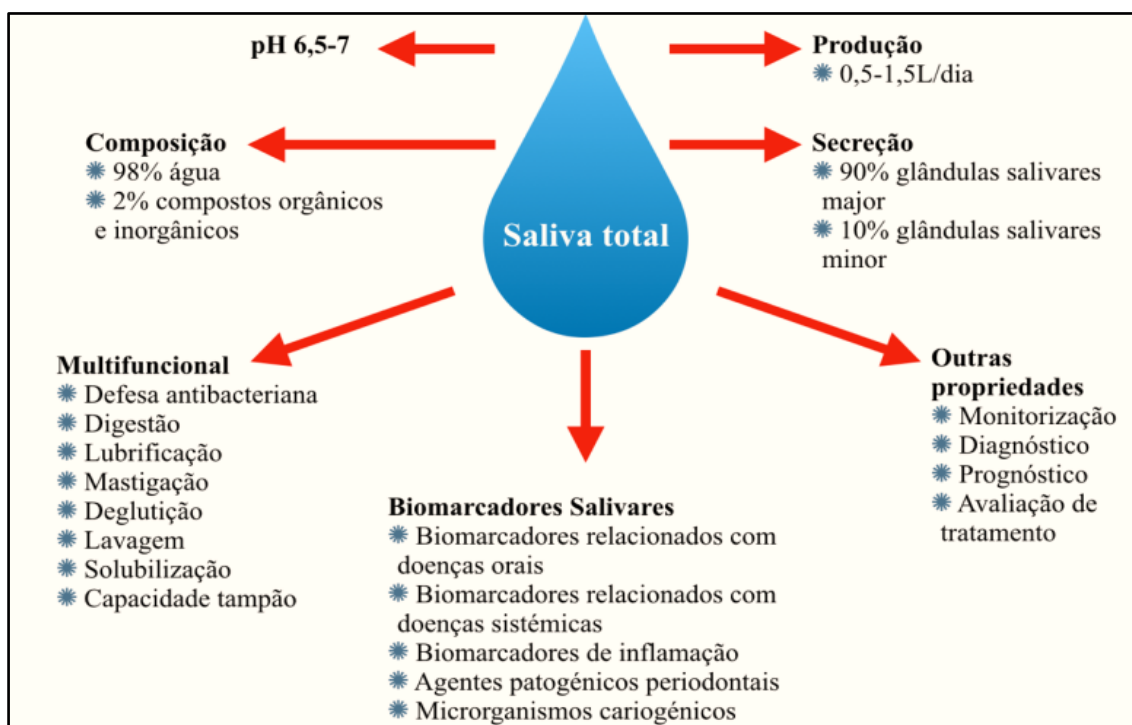
**Figura 1** - Localização e estrutura das glândulas salivares. (a) Localização das glândulas salivares principais. (b) Representação esquemática genérica de uma glândula principal. (Adaptado de Seeley et al., 2011).

Os componentes do sangue têm permeabilidade nas glândulas salivares, uma vez que estas são envolvidas por capilares. Desta forma, existe a possibilidade de trocas intracelulares ou extra celulares de moléculas constituintes do sangue com os da saliva, como presente na Figura 2 (Nunes & Macedo, 2013; Pfaffe et al., 2011).



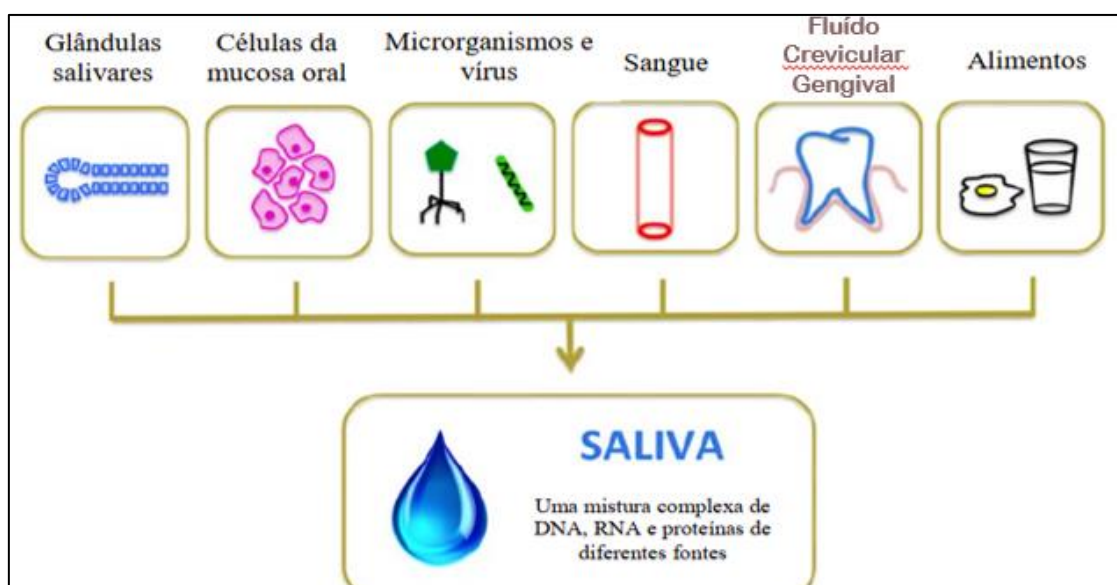
**Figura 2** - Mecanismo de transporte. (a) Entrada de componentes por filtração simples. (b) Entrada de compostos lipossolúveis por difusão passiva. (c) Entrada de componentes por transporte ativo. (d) Bombeamento ativo de íons  $\text{Na}^+$  e entrada cocomitante de  $\text{H}_2\text{O}$ . (e) componente produzido e secretado pelas glândulas salivares; (f) bombeamento de íons  $\text{Na}^+$  no sangue, produzindo líquido hipotônico. (Adaptado de Segal & Wong, 2008).

A saliva pode ser considerada total ou de glândula específica. Aquela recolhida diretamente do ducto excretor é denominada de saliva de glândula específica. A primeira classifica-se como um fluido misto, geralmente usado na pesquisa de patologias de ordem sistêmica, por ser maioritariamente proveniente das glândulas maiores e menores. É importante ter em atenção que a saliva total apresenta outros constituintes como: fluido crevicular, transudado da mucosa, secreções brônquicas e nasais, bactérias e fungos, derivados de sangue proveniente de feridas (Farnaud et al., 2010). As características relativas ao pH, produção diária, secreção, composição, biomarcadores salivares e outras propriedades da saliva total podem ser observadas na Figura 3 (Rathnayake et al., 2017). Relativamente à saliva de glândula específica, provêm de glândulas individuais, usadas para identificação de patologias específicas.



**Figura 3** - Resumo da composição, propriedades e fisiologia da saliva (Adaptado de Rathnayake et al., 2017).

Os fluidos e as biomoléculas que constituem a saliva são provenientes das glândulas salivares, das células da mucosa oral, de microrganismos e vírus, do sangue, do FCG e dos alimentos, como observado na Figura 4 (Zhang et al., 2016).



**Figura 4** - Origem dos fluidos e biomoléculas que constituem a saliva (Adaptado de Zhang et al., 2016).

A saliva desempenha um papel multifuncional. Contém uma função digestiva importante, com função de lubrificar e diluir o alimento. Outro papel da saliva é a proteção da cavidade oral, contra infecções bacterianas, virais e fúngicas (García-Godoy & Hicks, 2008). Esta proteção é também contra fatores biológicos, mecânicos e químicos, mantendo o ecossistema da cavidade oral em equilíbrio (Jankowska et al., 2007). Uma vantagem da saliva é melhorar a remineralização do esmalte dentário, evitando a desmineralização devido à sua capacidade tampão (García-Godoy & Hicks, 2008; Yoshizawa et al., 2013).

Tal como o sangue, a saliva é um fluido que têm presente diversas hormonas, anticorpos, constituintes antimicrobianos, enzimas e fatores de crescimento. Muitos destes constituintes entram na saliva a partir do sangue, passando pelos espaços entre as células por duas vias: transcelular (difusão intracelular passiva e transporte ativo), ou paracelular (ultrafiltração extracelular) (Rehak et al., 2000).

Autores referem que 30% das proteínas encontradas na saliva também estão no sangue, sendo importante ter em conta que a proteómica salivar poderá vir a ser um método de diagnóstico precoce e de controlo (Lee & Wong, 2009; Perez-Cornejo et al., 2012; Segal & Wong, 2008). Apesar disso, na saliva a concentração destas é menor que no sangue.

Com as novas tecnologias altamente sensíveis, o menor nível de dados analitos na saliva deixou de ser uma limitação. Atualmente, é possível detetar doenças a partir da saliva, que antes só era possível detetar quando realizadas análises sanguíneas. Como exemplo destas doenças temos HIV-1, HIV-2, hepatites virais A, B e C, e também monitorização de drogas (Segal & Wong, 2008). Deste modo, a saliva é funcionalmente equivalente ao sangue, refletindo o estado fisiológico do corpo, incluindo variações emocionais, hormonais, nutricionais e metabólicas (Lee & Wong, 2009).

Existem três pré-requisitos necessários para verificar o início e final de uma determinada doença ou a eficácia do tratamento: um método não invasivo para recolha de amostras biológicas; biomarcadores específicos associados à saúde ou doença; uma



plataforma tecnológica para discriminar rapidamente os biomarcadores (Malamud, 2011).

Uma iniciativa preconizada pelo Instituto Nacional de Pesquisa Odontológica e Craniofacial (NIDCR) relatou um guia para verificação do início e do final de uma determinada doença ou a eficácia do tratamento através do uso de fluídos orais como meio de diagnóstico para examinar o estado de saúde e de doença. Esta é uma oportunidade ideal para fazer a ligação entre os biossensores baseados na saliva e os biomarcadores salivares discriminatórios de doenças em aplicações de diagnóstico (Segal & Wong, 2008). A capacidade de avaliar com precisão biomarcadores em amostras obtidas da cavidade oral depende da natureza bioquímica do marcador, da fonte, do tipo de amostra recolhida, e do método pelo qual o marcador surge na cavidade oral (Malamud, 2011).

Os diferentes métodos de recolha de saliva dependendo da estimulação ou não estimulação, podem ter diferentes classificações. A saliva pode ser recolhida de diferentes formas. Saliva inteira em repouso ou não estimulada, saliva inteira estimulada, saliva glandular (principalmente parótida, com ou sem estimulação), saliva submandibular/ sublingual e saliva palatina. Para recolher saliva, o sujeito deve estar sentado, com a cabeça levemente inclinada para a frente e os olhos abertos (Priya & Prathibha K, 2017).

Na recolha da saliva os pacientes não devem comer ou beber quaisquer bebidas (com exceção da água pura), bem como não realizar nenhum procedimento higiênico dentro da cavidade oral, como por exemplo, escovar os dentes por pelo menos duas horas antes da recolha. Devido à influência que alguns medicamentos podem ter na secreção salivar, os pacientes não devem ingerir medicamentos pelo menos 8 horas antes da recolha salivar. A saliva deve ser recolhida em sala separada, com o paciente sentado, relaxado, com a cabeça levemente inclinada para baixo, com movimento mínimo da face e lábios, após 5 min de adaptação ao ambiente (Chojnowska et al., 2018).

A saliva estimulada é normalmente recolhida por ação indutora mastigatória (pastilha indutora), ou seja, através de um método absorvente para aumentar a taxa de fluxo salivar. Este método afeta a quantidade e o pH da saliva, sendo geralmente usado apenas em pacientes que têm dificuldade em produzir saliva suficiente. A saliva não

estimulada é recolhida sem estímulo exógeno e a taxa de fluxo é afetada principalmente pelo grau de hidratação. As três abordagens mais comuns para a recolha de saliva são: o método de drenagem, de cuspir, de sucção e de **Esfregaço** (Figura 5) (Priya & Prathibha K, 2017).



**Figura 5** - Métodos de recolha de saliva total. (a) Drenagem. (b) Cuspir. (c) Sucção (d) Esfregaço (Adaptado de Yamuna Priya & Muthu Prathibha, 2017).



**Figura 6** - Métodos de recolha de Saliva de glândula específica. (a) Saliva de glândula parótida usando copos de Carlson modificado. (b) Sialopaper, usado para recolha de saliva de glândulas salivares menores. (Adaptado de Yamuna Priya & Muthu Prathibha,

Para a recolha de saliva não estimulada existem dois métodos: cuspir e sucção, que são fáceis de aplicar em todo o fluxo de trabalho da clínica ao laboratório de pesquisa, aumentando assim a viabilidade de desenvolver métodos de recolha padronizados. Estudos demonstraram que os métodos de recolha de saliva não estimulados podem influenciar a composição salivar e afetar a detecção final do biomarcador específico. Um estudo demonstrou que a quantidade e a qualidade do DNA genómico bacteriano (gDNA) são comparáveis entre vários métodos de recolha de saliva (cuspir e sucção) e métodos de isolamento de DNA (por exemplo, kit comercial). No entanto, ainda não está claro se os métodos de recolha não estimulada

(cuspir e sucção) têm um grande impacto na expressão de mRNA específico do periodonto humano, fatores epigenéticos de metilação do DNA/RNA e níveis de metilação do DNA específicos do periodonto (Han, & Ivanovski, 2019).

Anteriormente à colheita, o ambiente deve ser organizado de forma a manter o tubo na posição vertical, fechado e encaixado no estojo/rack ou outro suporte semelhante. O estojo deve estar em uma mesa ou bancada o mais perto possível do profissional de recolha. Os kits normalmente contêm um *Swab* e um tubo com meio de transporte etiquetado com código de barras. O profissional deverá utilizar equipamento de proteção individual. Após explicar detalhadamente como será o procedimento, o tempo gasto e o incomodo do teste, o profissional pedirá ao paciente que abra a boca para exposição da cavidade oral e friccionará o *Swab* na parede posterior da faringe e na região amigdaliana esquerda e direita, ou no caso de as amígdalas já terem sido removidas ou se apresentarem visíveis, o *Swab* deverá ser friccionado na fossa tonsilar. Deve-se evitar o contato do *Swab* com a língua, dentes e gengivas (Malamud, 2011)

Após a colheita e retirada do *Swab* da cavidade oral, o profissional deverá abrir a tampa do tubo, o qual estará disposto no estojo/rack. A ponta do *Swab* deverá ser imersa no meio de transporte líquido do tubo realizando movimentos de rotação por alguns segundos. A haste do *Swab* terá de ser levantada levemente e cortada com uma tesoura seca e higienizada com álcool 70°. O *Swab* deverá ser mantido no tubo com uma tampa firmemente vedada. O estojo terá de ser mantido com as amostras em ambiente refrigerado ou de congelção (Yamuna Priya & Muthu Prathibha, 2017).

O tipo de amostra oral mais usado é o *Swab*, que recolhe uma amostra de DNA na qual o profissional faz a recolha com um tipo de cotonete, sendo depois enviada para um laboratório onde os profissionais pesquisam pelo material genético da doença nas células do paciente. A taxa de precisão é de 90%. A desvantagem deste método é ser invasivo, tendo em conta que o *Swab* pode causar engasgamento e tosse no paciente (Malamud, 2011).

Independentemente do método utilizado, os indivíduos devem ser instruídos a higienizar a boca com água antes da recolha de saliva para evitar que esta contenha

alterações (Lee & Wong, 2009). Na Figura 6 pode ser visualizado o material necessário para a recolha de saliva usando este método.



**Figura 7-** Material necessário para a recolha de saliva. (a) Tubos estéreis graduados com extremidade cônica. (b) Micropipeta automatizada para aspirar saliva. (c) Tubos de sucção dentários. (d) Tubo cônico de plástico para recolha de saliva. (Adaptado de Yamuna Priya & Muthu Prathibha, 2017).

Atualmente, os esfregaços nasais e orofaríngeos são os dois principais tipos de amostras do trato respiratório superior recomendados para teste diagnóstico de Covid-19, no entanto a saliva tem sido ultimamente utilizada como método complementar. Recentemente, um teste para avaliar o RNA em amostras de saliva foi recentemente aprovado pela US Food and Drug Administration para análises diagnósticas de Doença por coronavírus (Covid-19) (Ceron et al, 2020).

As amostras orais que apresentam maior utilidade para o diagnóstico de doenças sistêmicas incluem a saliva, fluido crevicular gengival (FGC). Os dados referidos por Malamud (2011), indicam que o uso bem-sucedido destes tipos de amostras orais para detetar ou prever a suscetibilidade de doenças sistêmicas (Malamud, 2011).

O fluido crevicular gengival (FGC) é o produto da interação entre biofilme bacteriano aderido na superfície do dente e das células periodontais. É uma mistura de substâncias derivadas do soro sanguíneo, leucócitos, células estruturais do periodonto e microrganismos orais. Estas substâncias têm uma grande capacidade para serem utilizadas como biomarcadores. A recolha e a análise de amostras de FGC constituem uma medida não invasiva de acesso ao estado fisiopatológico do periodonto de uma zona específica. Chibebe et al. (2012), indica que o uso de anticorpos ou mediadores são potenciais auxiliares no diagnóstico.

## **2. Alvos moleculares de diagnóstico na saliva**

O proteoma é o complemento protéico do genoma e a proteômica é a análise da porção do genoma que é expressa. Os proteomas nos fluídos corporais são importantes devido ao seu alto potencial clínico como biomarcadores de doenças. Normalmente, uma análise global dos proteomas salivares humanos pode fornecer um espectro abrangente de saúde bucal e geral. Para além de a análise de proteomas salivares ao longo de complicações poder revelar assinaturas de morbilidade no estágio inicial e monitorizar a progressão da patologia (Lee & Wong, 2009).

Em 2003, o Instituto Nacional de Pesquisa Odontológica e Craniofacial (NIDCR) identificou e catalogou proteínas salivares humanas das três principais glândulas salivares. O proteoma salivar humano (HSP) pode ser um recurso para auxiliar a elucidar a patogénese da doença, bem como avaliar a influência dos medicamentos na estrutura, composição e secreção de todos os constituintes secretores salivares (Segal & Wong, 2008).

O NIDCR identificou, aproximadamente, 1166 proteínas (Denny et al., 2008), definindo assim o proteoma salivar. Depois deste estudo, foi possível reconhecer biomarcadores importantes para diagnosticar o cancro oral (Hu et al., 2008) e outras patologias, tais como, Síndrome de Sjögren's (Hu et al., 2007)

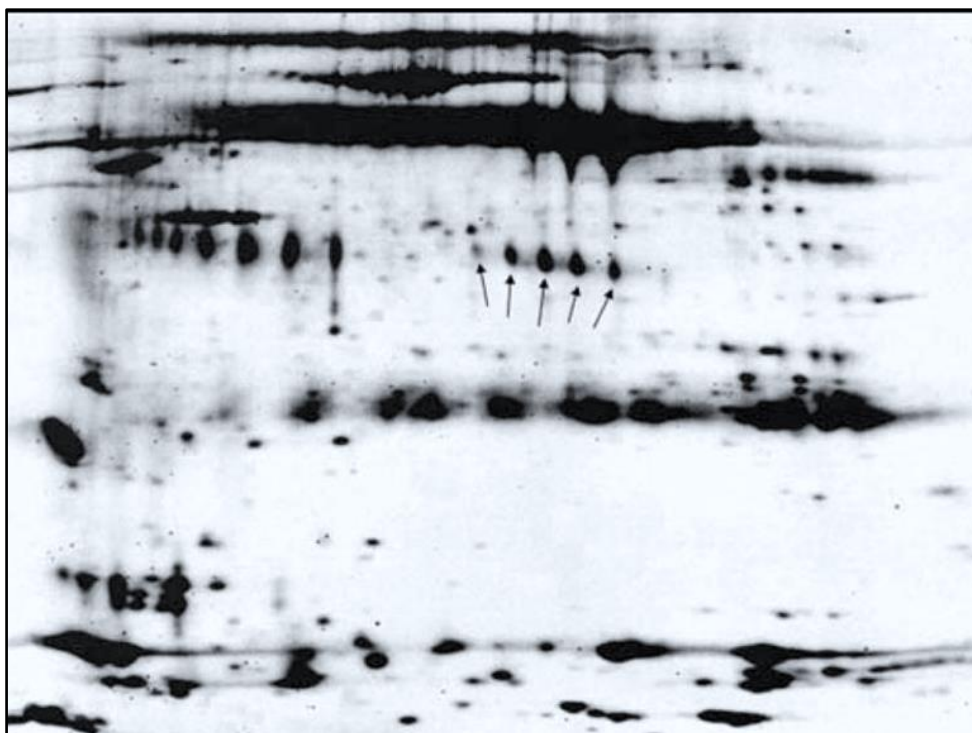
Outras iniciativas também surgiram com objetivo de descobrir e desenvolver outra forma de recurso para diagnosticar a nível molecular. Como exemplo destes: o transcriptoma oral (conjunto de transcritos presentes na saliva); o metaboloma oral (conjunto de todos os metabolitos encontrados na saliva); e o microbioma oral (conjunto de todos os microrganismos que habitam a cavidade oral). Estes estudos possibilitaram identificar na saliva múltiplos biomarcadores com competência para diagnóstico (Segal & Wong, 2008) conforme é possível observar na Tabela 2.

**Tabela 2** - Diferentes classes de marcadores identificados na saliva e as suas aplicações possíveis.  
(Adaptado de Segal & Wong, 2008).

<b>Classe do biomarcador</b>	<b>Aplicações possíveis</b>
DNA	Genotipagem comum Infecções bacterianas Diagnóstico do cancro da cabeça e pescoço Ciências forenses
RNA	Identificação de bactérias/vírus Diagnóstico de cancro oral
Proteínas	Diagnóstico de periodontite Diagnóstico de cancro Suscetibilidade a cáries
Mucinas/glicoproteínas	Diagnóstico do cancro da cabeça e pescoço Suscetibilidade a cáries
Imunoglobulinas	Infecções virais (VIH, hepatite B e C)
Metabolitos	Várias condições endócrinas Avaliação do stress/estado psicológico Diagnóstico de periodontite Diagnóstico de fibrose cística
Fármacos seus metabólitos	Monitorização do abuso de fármacos (anfetaminas, opióides, cocaínas) Controle de administração de fármacos terapêuticos
Vírus	Reativação de vírus Epstein-Barr (mononucleose)
Bactérias	Diagnóstico de cancro oral Suscetibilidade a cáries
Componentes celulares	Diagnóstico de cancro da cabeça e pescoço

A facilidade na recolha de espécimes de saliva, proporciona uma simplicidade na determinação dos níveis hormonais, incluindo estrogénio (estradiol), progesterona, testosterona, dihidroepiandrosterona (DHEA) e cortisol (Rosa, 2011).

Nas últimas três décadas foram usadas abordagens baseadas em proteoma para monitorizar as mudanças na expressão de proteínas. Geralmente, a expressão da proteína é analisada principalmente por eletroforese em gel de poliacrilamida uni ou bidimensional (PAGE). Para resolver a composição complexa da saliva, o 2-D PAGE permite a separação não apenas de diferentes moléculas com pesos moleculares semelhantes, mas também de diferentes padrões de modificação ou isoformas da mesma proteína (Figura 7) (Lee & Wong, 2009).



**Figura 8** - Electroforetograma em gel 2D de proteínas da saliva total humana. (As proteínas foram separadas nos gradientes de pH imobilizados (IPG) da 1ª dimensão, seguidos por SDS-PAGE. Os salpicos foram visualizados pela mancha SYPRO Ruby. As setas indicam cinco isoformas do precursor de carbonato desidratase VI. Os alvos de interesse serão identificados por análises subsequentes dos EM. (Adaptado de Lee & Wong, 2010).

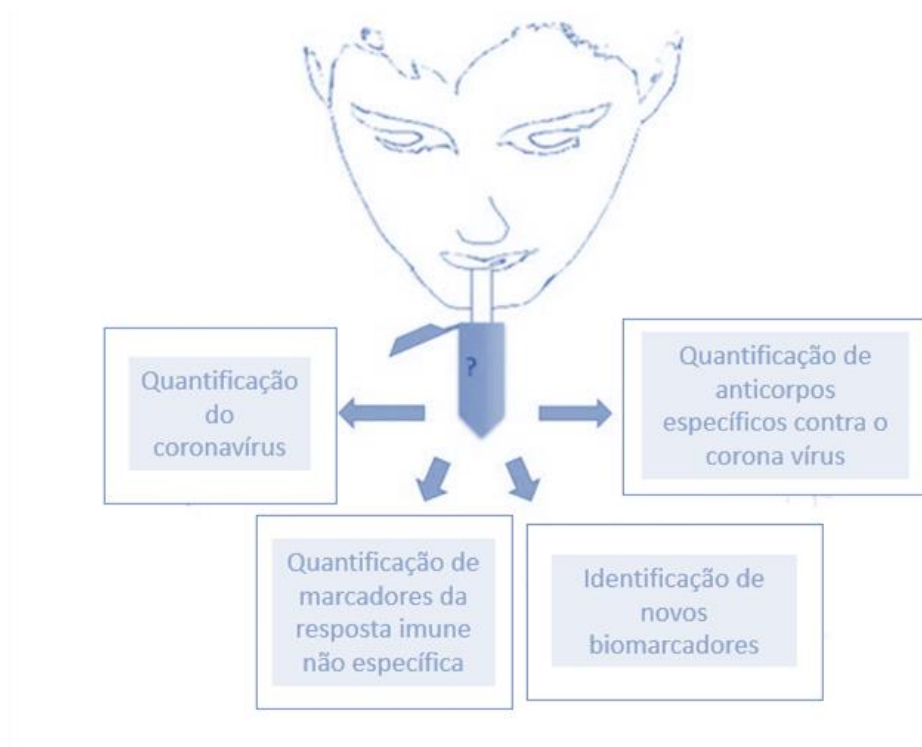
Apesar de os proteomas terem um papel importante no diagnóstico, a tecnologia de transcrição salivar conseguiu melhorar o potencial diagnóstico da saliva para múltiplas aplicações em medicina. A tecnologia proteômica ajudou a identificar os biomarcadores salivares, descrevendo a importância do proteoma e a análise da proteômica expressa. A existência dos proteomas nos fluidos corporais representa um alto potencial de marcadores de patologias. Uma análise precisa do proteoma da saliva humana pode indicar o estado geral de saúde. Muitas alterações funcionais das proteínas resultam de modificações pós-traducionais, como fosforilação, glicosilação, acetilação e metilação (Lee & Wong, 2009).

Há um forte indicio na literatura que as consequências de **investigações** proteômicas apresentam-se com grande potencial em várias áreas como diagnóstico, classificação dos subtipos de patologias, prognóstico clínico, monitorização da resposta da terapia aplicada, quantificação de biomarcadores e geração de alvos terapêuticos (Walsh et al., 2010).

A tecnologia transcriptômica permitiu aos pesquisadores descobrir os transcriptomas salivares (moléculas de RNA) que incluem as moléculas que as células usam para transportar informações fornecidas pelo DNA, para a produção de proteínas. Esta possibilidade, fornece à pesquisa médica uma segunda ferramenta de diagnóstico que envolve saliva e que pode oferecer mais e melhores oportunidades para o diagnóstico salivar (Lee & Wong, 2009).

No que diz respeito ao SARS-CoV-2, a saliva poderia ser usada para avaliar diferentes aspetos da doença, conforme mostrado na figura 8.





**Figura 9** - Utilização de saliva em Covid-19. (Adaptado de Ceron, 2020).

Em três grupos de pesquisas que utilizaram a saliva para detecção de SARS-CoV-2 (To et al 2020; Azzi et al 2020; Han et al 2019), num dos grupos os investigadores identificaram o RNA do vírus em 20 de 23 pacientes previamente confirmados com Covid-19 positivos, obtendo um resultado de sensibilidade diagnóstica de 87%. Utilizaram a saliva recolhida, pedindo ao paciente para tossir saliva da sua garganta para um recipiente estéril e adicionando um meio de transporte viral à amostra. A detecção do vírus foi feita por reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcrição reversa em tempo real (rRT-PCR) (To et al, 2020).

To et al. (2020) avaliaram a validade diagnóstica, o tempo de recolha da amostra e o custo associado ao uso da saliva, através de um estudo prospectivo de validade diagnóstica e comparando a taxa de detecção de vírus respiratórios entre a saliva e o aspirado nasofaríngeo entre pacientes adultos hospitalizados. Os autores concluíram que as amostras de saliva têm alta sensibilidade e especificidade na detecção de vírus respiratórios em comparação com aspirado nasofaríngeo. O uso de saliva também reduz o tempo e os custos associados à recolha da amostra.

Azzi et al. (2020) analisaram por rRT-PCR amostras salivares de 25 pacientes em estado grave ou muito grave de Covid-19, diagnosticados positivamente para SARS-CoV-2 anteriormente através de esfregaço faríngeo e orofaríngeo. A recolha da saliva foi realizada através de baba passiva. Nos casos de pacientes submetidos à intubação endotraqueal e ventilação mecânica, a saliva foi recolhida por via intrabucal, por médico, com uso de pipeta. Essas amostras possivelmente também continham secreções respiratórias. Os valores da lactato desidrogenase (LDH) e da proteína C reativa ultrasensível (usRCP) foram registrados no mesmo dia da recolha do *Swab* salivar. Foram consideradas a positividade na saliva e a associação entre os dados clínicos e o limiar do ciclo como indicador semiquantitativo da carga viral. Dois pacientes apresentaram resultados salivares positivos nos mesmos dias em que seus *Swabs* faríngeos ou broncoalveolares foram negativos. Este facto aponta para a possibilidade de que os indivíduos possam ser contagiosos pela saliva, mesmo quando os esfregaços faríngeos sejam negativos. Isto poderia ser benéfico devido à possibilidade de utilizarmos a saliva para detetar o vírus, ao considerarmos as glândulas salivares como um reservatório potencial para Covid-19 em pessoas assintomáticas, mas infetadas. Os autores concluíram que a saliva é uma ferramenta confiável para detetar SARS-CoV-2. O papel da saliva no diagnóstico da Covid-19 não pode se limitar a uma deteção qualitativa do vírus, mas também pode fornecer informações sobre a evolução clínica da doença.

Han et al. (2019) recolheram saliva de um recém-nascido de 27 dias com diagnóstico de Covid-19 e relataram que os valores foram semelhantes aos obtidos com *Swabs* faríngeos, mas inferiores aos dos *Swabs* broncoalveolares.

Ceron et al. (2020) num relatório para obter informações atualizadas sobre o uso de saliva como amostra para análises laboratoriais em investigações Covid-19, concluíram que um conhecimento mais aprofundado sobre as possíveis alterações no proteoma da saliva pode permitir a identificação de novos biomarcadores diagnósticos ou auxiliar no entendimento dos mecanismos associados à doença. Com o desenvolvimento de métodos adequados de recolha e processamento de amostras e o uso de ensaios adequados, a saliva pode fornecer informações clínicas úteis sobre a doença e pode ser potencialmente incluída nas diretrizes para recolha de amostras para o diagnóstico, gestão da doença e controle de Covid-19.

## 2.1 Caracterização da saliva

A caracterização da saliva é realizada por cromatografia, espectrometria de massa e imunoensaio colorimétrico (Al-Shehri et al., 2013; Novaković et al., 2013; Salazar et al., 2013).

As metodologias podem ser classificadas em dois tipos: *bottom-up* ou *shotgun* e *top-down*. Na *bottom-up* ou *shotgun* recorre-se à cromatografia líquida para a separação dos péptidos de uma solução complexa e, posteriormente, a realização da espectrometria de massa (MS) para análise dos mesmos. É um método favorável no entanto, péptidos perdem-se durante a cromatografia e algumas pós-transducionais ficam irreconhecíveis. No caso da metodologia *top-down*, recorre-se à MS para análise das proteínas na sua forma complexa, esta é a mais vantajosa, pois são analisados porções e isto diminui desaparecimentos de péptidos fornecendo assim uma análise completa (Armirotti & Damonte, 2010).

A espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) também tem sido utilizada para caracterizar amostras biológicas como uma técnica alternativa para testes de laboratório. Alguns estudos demonstraram a alta sensibilidade do FTIR para analisar o músculo esquelético (Jerônimo et al., 2012), músculo cardíaco (Cheheltani et al., 2012) e alguns fluidos biológicos, como o soro (Carvalho et al., 2014), a urina (Khaskheli et al., 2013) e saliva (Khaustova et al., 2010). Os poucos estudos que analisaram a saliva pelo FTIR produziram resultados promissores com a análise quantitativa de componentes bioquímicos a fornecerem informações em tempo real e sem o uso de reagentes (Caetano et al., 2015; Khaustova et al., 2010; Perez-Guaita et al., 2012).

### **3. Saliva como meio de diagnóstico**

A saliva tornou-se um recurso importante para avaliar condições fisiológicas e patológicas. Com o acréscimo de técnicas inovadoras e equipamentos de instrumentação química ocorreu o aumento da sua utilização em investigações laboratoriais, aplicáveis a análises básicas e clínicas (Lima et al., 2014).

#### **3.1 Patologias Sistêmicas**

Historicamente, as patologias sistêmicas são diagnosticadas através de sintomas referidos pelo paciente; exame observacional; história clínica; e análise sanguíneas e de urina. As análises são feitas em laboratório e analisadas pelo médico (Malamud, 2011).

A capacidade de monitorizar a saúde e o bem-estar dos pacientes, bem como detetar patologias sistêmicas precocemente através de meios não invasivos, são objetivos desejáveis na promoção e prestação de cuidados de saúde (Lee et al., 2009).

As patologias sistêmicas são muito difíceis de diagnosticar sem investigações complementares mais invasivas. Desta forma, os investigadores tentam encontrar biomarcadores moleculares, que podem ser facilmente identificados e onde podem implementar com sucesso um diagnóstico rápido e não invasivo (Roi et al., 2019).

A inflamação sistêmica tem formas agudas e crônicas, onde os processos bioquímicos libertam citocinas como sinais de emergência que trazem as células imunológicas do corpo e ativam o sistema imunológico inato e nutrientes para combater a inflamação. Estão a ser identificados diversos biomarcadores moleculares específicos para diferentes condições, como tumores oncológicos, diabetes e doenças cardiovasculares (Hu et al., 2008); Zhang et al., 2016a).

A saliva é uma via emergente a ser explorado para a vigilância da saúde e das patologias, bem como, para a medicina. (Lee et al., 2009).

As patologias sistêmicas influenciam as glândulas salivares, alterando a quantidade e os constituintes da saliva. É importante ter estes aspetos em consideração pois estes

vão alterar as proteínas e estas tem elementos genómicos que são relevantes (Farinha, 2015).

Segundo Buczko, Zalewska, & Szarmach (2015) a avaliação do *status do stress* oxidativo foi proposta como um fator importante no diagnóstico do desenvolvimento e na progressão de patologias gerais como doença periodontal, cancro oral, diabetes, artrite reumatoide, insuficiência renal crónica, síndrome da apneia obstrutiva do sono e HIV. Para além disso, os metabólitos do triptofano medidos no plasma e na saliva são propostos como marcadores novos e sensíveis do status do stress oxidativo. Assim, a medição do stress oxidativo no fluído salivar pode fornecer uma ferramenta para o diagnóstico, monitorização e tratamento de algumas patologias sistémicas, bem como de distúrbios patológicos locais.

O DNA humano demonstrou ser vantajoso como biomarcador e tem sido estudado diagnóstico de neoplasias. A maioria das amostras utilizadas para esse tipo de pesquisa é recolhida através de biópsias invasivas e, normalmente, a análise é feita quando o tumor já está avançado. Nesse contexto, é sugerido que a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas de diagnóstico que possivelmente levem à deteção precoce da patologia (Spielmann & Wong, 2011).

Franzmann et al. (2005) avaliaram o uso da proteína CD44 na saliva como um potencial marcador molecular para cancro de cabeça e pescoço e concluíram que o teste pode ser eficaz para a deteção desse tipo de cancro em todas as etapas.

Li et al. (2004) mostraram que tumores malignos localizados na cabeça e pescoço podem ser diagnosticados através da saliva com precisão de 91%, importante para o diagnóstico precoce e aumentando a possibilidade de tratamento bem-sucedido.

O diagnóstico de cancro de mama através de amostras salivares já foi estudado e Streckfus & Bigler (2005), analisaram as amostras salivares de 30 pacientes, identificaram 49 proteínas, que distinguem pacientes saudáveis dos pacientes com diagnóstico de cancro de mama. Pesquisas mostraram que a presença deste tipo de tumor produz alterações na quantia e características das proteínas presentes nas glândulas salivares. A análise da proteína salivar também distinguiu se os tumores de mama eram malignos ou não.

Ceron et al. (2020) concluíram que a saliva pode ter aplicações potenciais no contexto de Covid-19 pela detecção direta do vírus. A utilização de saliva para o diagnóstico de muitas infecções virais tem sido relatado, no entanto, muitas vezes não é realizado nos diagnósticos de rotina. Um dos maiores obstáculos está na etapa de recolha de espécimes, aumentando os riscos de uma infecção cruzada de determinadas doenças infectocontagiosas como o SARS-CoV-2. A utilização dos testes salivares nestes casos reduziria os riscos de transmissão do vírus para os profissionais de saúde evitando a tosse e os espirros decorrentes da utilização dos *Swabs* quando utilizados na região nasal e orofaríngea. Esta técnica é ainda de fácil execução, e pode ser realizada pelo próprio paciente.

A diabetes caracteriza-se por uma hiperglicemia crónica, ou seja, elevados níveis de glicémia sanguíneos, o que resulta em distúrbios no metabolismo, nomeadamente processos metabólicos que originam glucose. (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus, 2005). As proteínas salivares têm demonstrado ser úteis como complemento de métodos de diagnóstico e controlo. Entretanto, é necessária uma melhor caracterização e validação dos biomarcadores, bem como a investigação de outros. Em suma,  $\alpha$ -defensina, A1T1, A2MG, RBP4, GADPH e AMY-1 são alguns possíveis biomarcadores salivares de diabetes. Estas modificações, tanto na qualidade, como quantidade no proteoma salivar são bastante expressivas e tem se mostrado uma bom alicerce para novos testes não-invasivos, como na detecção e monitorização da diabetes (Gonçalves, 2015).

Os problemas cardiovasculares possuem uma elevada taxa de mortalidade. Os marcadores encontrados na saliva, como  $\alpha$ -amilase têm sido utilizados no controle pós-operatório de pacientes submetidos a cirurgia cardiovascular. Um estudo efetuado por Adam et al, (1999) demonstrou que baixos níveis de  $\alpha$ -amilase salivar no pré-operatório de pacientes com aneurisma da aorta estão associados a um aumento da mortalidade. Outro estudo, realizado por Samaranayake em 2007 verificou que a atividade salivar da  $\alpha$ -amilase poderia ser utilizada como um bom marcador de catecolaminas, durante a avaliação de pacientes em diferentes situações stressantes. Essas investigações demonstram a possibilidade de usar saliva para avaliar a saúde geral de um indivíduo.

Cozma et al. (2017) apresentaram uma visão geral de estudos publicados entre 2010 e 2015, nos quais o cortisol salivar e a  $\alpha$ -amilase foram medidos como biomarcadores de stress para examinar suas associações com indicadores clínicos e subclínicos de risco cardiovascular. Foi observado que o impacto biológico do stress medido pelo cortisol salivar e  $\alpha$ -amilase estava associado a fatores cardiovasculares. Os autores concluíram que embora a saliva ainda não tenha se tornado uma fonte de amostra comum para a análise de biomarcadores de stress, este é um campo de pesquisa em evolução e pode representar um método confiável de investigação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e pelo sistema simpático-adrenomedular (SAM), por forma a evitar a punção venosa e oferecendo a possibilidade de auto recolha pelos indivíduos.

A pesquisa de biomarcadores incluídos na patologia cardiovascular (como aterosclerose, patologias no miocárdio), faz com que seja possível a detecção antecipada da doença, contribuindo para a melhoria dos conhecimentos em torno desta patologia. Para alguns estudiosos, a utilização de fluídos orais é uma área muito promissora, uma vez que os biomarcadores presentes no sangue também foram encontrados na saliva. (Foley et al., 2012; Zheng et al., 2014)

### **3.2 Patologias Psicoemocionais**

Distúrbios da mente, como depressão, ansiedade e transtorno bipolar são doenças que não apresentam marcas, e também não existem testes laboratoriais que identifiquem no organismo os sinais destas patologias que, normalmente, são diagnosticadas a partir dos sintomas apresentados pelos pacientes. Atualmente, existem pesquisas que investigam os biomarcadores com potencial para detetar problemas emocionais e psiquiátricos (Bahn et al., 2013).

Alguns estudos consideram os níveis de cortisol salivar uma medida confiável da relação entre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) com o stress (Kaczor-Urbanowicz et al., 2017; Zhang et al., 2016). Mas, para Hellhammer et al. (2009) o cortisol salivar pode ser utilizado como um biomarcador na pesquisa do stress, no entanto, devem-se considerar variáveis, tais como: estrogénio (sexo, ciclo menstrual, contraceptivos orais) ou condições médicas que podem afetar a ligação ao cortisol e a resposta à HPA (Pereira de Lima et al., 2020). Outro estudo, verificou que o níveis aumentados de cortisol relacionam-se com transtornos psicológicos como o stress, anorexia nervosa, entre outros (Pereira de Lima et al., 2020).

Uma tarefa importante na pesquisa psiquiátrica é encontrar medidas biológicas que possam prever o comportamento suicida. Os distúrbios do eixo HPA estão bem documentados entre os pacientes que sofrem de distúrbios psiquiátricos, em particular o transtorno depressivo maior (MDD) (Bao et al., 2008). A maioria dos estudos indica uma hiperatividade do eixo HPA em pacientes com depressão presente (Claes, 2004; Pariante, 2003). No entanto, a baixa atividade do eixo HPA tem sido proposta em depressão com características atípicas, bem como em transtornos depressivos e crónicos (Lindqvist et al., 2008). Entre os que tentam suicídio, os pacientes com transtornos de personalidade do Eixo II apresentam níveis mais baixos de cortisol do que aqueles sem este diagnóstico (Westrin & Niméus, 2003). Existem também evidências de hipoatividade do eixo HPA na fisiopatologia dos distúrbios relacionados ao stress e à fadiga (Heim et al., 2000; Lindqvist et al., 2008).



O *stress* psicológico agudo tem influência tanto na composição como na função salivar, conseguindo ativar dois sistemas biológicos nomeadamente, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) e o eixo simpático-adrenal (SAM). A procura de um marcador não invasivo e facilmente atingível idêntico ao do eixo SAM projetou a  $\alpha$ -amilase salivar (AAS) como um marcador proposto.

A  $\alpha$ -amilase salivar é uma enzima importante para a digestão de carboidratos e a sua secreção está sob controlo neuro-hormonal, ou seja, ela é libertada mediante estimulação simpática (Wolf et al., 2008). A enzima salivar  $\alpha$ -amilase tem sido proposta como marcador de *stress* induzido por atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS). Trata-se de uma das mais importantes proteínas da saliva, sendo responsável pela digestão enzimática do amido e tendo efeito na atividade microbiana, favorecendo a mesma pelo fornecimento de substrato para as suas vias metabólicas de geração de energia e inibindo a aderência e crescimento de bactérias, sendo também importante para a imunidade da mucosa oral (Bosch et al., 2003). Alguns autores têm sugerido que a  $\alpha$ -amilase salivar desempenha um papel na modulação da adesão bacteriana às superfícies orais. O cortisol salivar indica a ação do eixo HPA, e a  $\alpha$ -amilase é sugerida como um biomarcador da ação simpática (Wolf et al., 2008).

Neste contexto, Castilho et al. (2011) verificaram a ligação entre alguns agentes salivares (fluxo estimulado e não-estimulado, capacidade-tampão e atividade de  $\alpha$ -amilase) bem como o *stress* sentido por mulheres em situações normais. Foram selecionados 13 voluntários do género feminino, com idade entre de 28-35 anos. O estudo procurou determinar: fluxo salivar estimulado (FSE) e não-estimulado (FSNE); capacidade tampão (CT); atividade de  $\alpha$ -amilase salivar (AAS) pelo método colorimétrico (Caraway modificado) e índice de *stress* percebido (EP) pelo questionário de Cohen. Os autores concluíram que nas condições normais de stress, não houve ligação entre o fluxo e a capacidade tampão na atividade de  $\alpha$ -amilase salivar com o stress significativo

### **3.3 Vantagens da utilização da saliva como meio de diagnóstico**

Considerando a precisão, eficácia, facilidade de uso e relação de custo-benefício, os testes de diagnóstico salivar demonstram suas aplicações nas ciências clínicas e básicas. Para além disso, as técnicas de diagnóstico baseadas em saliva têm potencial para permitir a triagem de uma população inteira para uma patologia específica (Lee et al., 2009). Vários estudos referem que usar a saliva para monitorizar a saúde e as diversas doenças, principalmente pelas suas características de método de diagnóstico barato, não invasivo e fácil de usar (Lee et al., 2009).

Segundo Lee & Wong, (2009) uma das principais vantagens da saliva como ferramenta de diagnóstico é que a recolha de amostras é fácil e não invasiva, diminuindo drasticamente o desconforto associado à recolha de sangue e aos problemas de privacidade associados à recolha de urina. Sendo a recolha salivar um procedimento simples, rápido e não invasivo, permite que se torne mais fácil, até porque pode ser executada por indivíduos sem qualificação exigida, ao contrário das recolhas de sangue, que requerem uma formação mais exigente.

Como utilização clínica, a saliva tem muitas vantagens em relação ao sangue. A saliva é fácil de recolha, conservação e envio, podendo ser obtida a baixo custo e em quantidades satisfatórias para análise. Por ser uma técnica não invasiva, diminui o *stress* causado no doente, e também facilita a quantidade de recolha para controlo. Também para os profissionais na área da saúde esta recolha é mais vantajosa, pois permite maior segurança e redução do tempo exposição, reduzindo assim o contágio de doenças transmissíveis (Lee et al., 2009).

A saliva é também mais acessível de manipular nos procedimentos de diagnóstico, pois não forma coágulos, diminuindo as manipulações necessárias. Os diagnósticos baseados na saliva são, portanto, mais acessíveis e precisos (Lee et al., 2009; Nagler et al., 2002).

Deste modo, o diagnóstico baseado na saliva é muito útil podendo ser uma opção para médicos dentistas e outros profissionais da saúde para diagnóstico clínico e de monitorização (Lee & Wong, 2009).

### **3.4 Desvantagens da utilização da saliva como meio diagnóstico**

Uma das desvantagens que era apontada sobre a utilização da saliva como fluído de diagnóstico está relacionada com o facto dos analitos informativos estarem, geralmente, presentes em menores quantidades na saliva, em comparação com o sangue. Para as novas técnicas, muito mais sensíveis, este nível menor de analitos na saliva não é mais uma limitação. Quase tudo o que se pode medir no sangue, é também possível medir na saliva (Javaid et al., 2016).

O facto de não existir um método de recolha standard para os diferentes estados patológicos é apontado como uma desvantagem do diagnóstico salivar. É, portanto, necessário que se defina um protocolo de modo a que a análise salivar traduza corretamente o funcionamento das glândulas e que possa identificar estados de saúde e de doença (Rahim et al., 2015).

### **3.5 Limitações**

Apesar dos estudos das proteínas e dos seus componentes já permitirem identificar alterações no estado de saúde, só depois de um estudo completo do proteoma salivar saudável é que será possível estabelecer correlações com algumas doenças (Amado et al., 2013).

Será necessário realizar mais estudos para que o diagnóstico baseado em amostras de saliva, possa ser usado com frequência. Os métodos de recolha salivar e os biomarcadores necessitam de ser padronizados e validados. Para além disto, novos ensaios e dispositivos precisam ser desenvolvidos a um custo comercialmente viável. Custos elevados podem exigir um acordo de cooperação entre diferentes partes interessadas, incluindo o governo, instituições académicas e setor privado (Javaid et al., 2016).

### **III. CONCLUSÃO**

Sabe-se que a saliva humana é de extrema importância para a saúde oral, desempenhando um papel essencial no processo do correto desempenho da regulamentação do organismo humano. Para alguns investigadores, a saliva é referida como o “espelho do corpo”, por apresentar a habilidade de mostrar como o organismo se encontra, se está saudável ou não.

A saliva apresenta uma grande variedade de componentes podendo ser proteicos ou não, mas sempre com o objetivo de conservar a saúde oral. Estes constituintes apresentam uma enorme quantidade de informação para a deteção de doenças, sendo responsável pelos marcos biológicos imprescindíveis na verificação de níveis de doenças nos indivíduos. A acumulação do fluxo salivar das moléculas e as possíveis alterações descomplicam a averiguação tanto do estado fisiológico normal, como de prováveis patologias ou ainda a decifração do organismo a determinadas terapêuticas.

Nas últimas décadas, a saliva demonstrou uma elevada utilidade e capacidade para diagnosticar patologias orais e sistémicas nas últimas décadas. A abordagem é segura e não invasiva, a facilidade de recolha e o custo economicamente viável, tornam este fluido bastante eficaz para o diagnóstico e a monitorização das mais diversas patologias. Assim, o diagnóstico salivar é um campo dinâmico e emergente, utilizado na deteção de inúmeras doenças. A utilização de fluídos orais vem alargando as perspetivas no diagnóstico clínico, na monitorização de patologias e na tomada de decisão no atendimento ao paciente.

Desta forma, o diagnóstico salivar traz uma expectativa significativa para Medicina Dentária, sendo uma alternativa inovadora e mais simples de diagnóstico quando comparado com os métodos atuais. Este método confere maior conforto aos pacientes, visto ser menos invasivo quando comparado com o método de recolha de urina e as análises ao sangue.

Para que a saliva possa ser mais utilizada como meio de diagnóstico é essencial estabelecer fundamentação científica e as validações clínicas de modo a posicionar esta ferramenta diagnóstica como uma tecnologia altamente precisa e viável para avaliação do estado de saúde dos indivíduos.



## IV. BIBLIOGRAFIA

Adam, D. J., Milne, A. A., Evans, S. M., Roulston, J. E., Lee, A. J., Ruckley, C. V., & Bradbury, A. W. (1999). Serum amylase isoenzymes in patients undergoing operation for ruptured and non-ruptured abdominal aortic aneurysm. *Journal of Vascular Surgery*, 30(2), 229–235. [https://doi.org/10.1016/S0741-5214\(99\)70132-1](https://doi.org/10.1016/S0741-5214(99)70132-1)

Al-Shehri, S., Henman, M., Charles, B. G., Cowley, D., Shaw, P. N., Liley, H., Tomarchio, A., Punyadeera, C., & Duley, J. A. (2013). Collection and determination of nucleotide metabolites in neonatal and adult saliva by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 931, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.05.001>

Alberice, J. V. (2014). *Avaliação analítica de potenciais biomarcadores para câncer de bexiga em urina* [Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/T.75.2014.tde-28082014-152517>

Almeida, P. D. V., Grégio, A. M. T., Machado, M. Â. N., De Lima, A. A. S., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 72–80. <https://doi.org/10.5005/jcdp-9-3-72>

Amado, F. M. L., Ferreira, R. P., & Vitorino, R. (2013). One decade of salivary proteomics: Current approaches and outstanding challenges. *Clinical Biochemistry*, 46(6), 506–517. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.10.024>

Armirotti, A., & Damonte, G. (2010). Achievements and perspectives of top-down proteomics. *Proteomics*, 10(20), 3566–3576. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000245>

Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, Fasano M, Sessa F, Tettamanti L, Carinci F, Maurino V, Rossi A, Tagliabue A, Baj A. (2020). Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 81(1):e45-e50. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.005.

Bahn, S., Schwarz, E., Harris, L. W., Martins-de-Souza, D., Rahmoune, H., & Guest, P. C. (2013). Testes sanguíneos de biomarcadores para diagnóstico e tratamento de desordens mentais: Foco em esquizofrenia. In *Revista de Psiquiatria Clínica* (Vol. 40, Issue 1, pp. 2–9). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. <https://doi.org/10.1590/s0101-60832012005000005>

Bao, A. M., Meynen, G., & Swaab, D. F. (2008). The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. In *Brain Research Reviews* (Vol. 57, Issue 2, pp. 531–553). Brain Res Rev. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.04.005>

Bosch, J. A., De Geus, E. J. C., Veerman, E. C. I., Hoogstraten, J., & Nieuw Amerongen, A. V. (2003). Innate secretory immunity in response to laboratory stressors that evoke distinct patterns of cardiac autonomic activity. *Psychosomatic Medicine*, 65(2), 245–258. <https://doi.org/10.1097/01.PSY.0000058376.50240.2D>

Brinkman, B. M. N., & Wong, D. T. W. (2006). Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. *Current Opinion in Oncology*, 18(3), 228–233. <https://doi.org/10.1097/01.cco.0000219250.15041.f8>

Buczko, P., Zalewska, A., & Szarmach, I. (2015). Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 66(1), 3–9. <https://europepmc.org/article/med/25716960>

Cacabelos, R. (2009). Pharmacogenomic Biomarkers in Neuropsychiatry: The Path to Personalized Medicine in Mental Disorders. In *The Handbook of Neuropsychiatric Biomarkers, Endophenotypes and Genes* (pp. 3–63). Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-90-481-2298-1\\_1](https://doi.org/10.1007/978-90-481-2298-1_1)

Caetano, P. C., Strixino, J. F., & Raniero, L. (2015). Analysis of saliva by fourier transform infrared spectroscopy for diagnosis of physiological stress in athletes. *Revista Brasileira de Engenharia Biomedica*, 31(2), 116–124. <https://doi.org/10.1590/2446-4740.0664>



- Carranza, M., Ferraris, M. E., & Galizzi, M. (2005). Structural and morphometrical study in glandular parenchyma from alcoholic sialosis. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 34(6), 374–379. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2005.00281.x>
- Carvalho, C. da S., Andrade, L. E. C., Keusseyan, S. P., Rangel, J. L., Ferreira-Strixino, J., Martin, A. A., & Raniero, L. J. (2014). Study of advanced rheumatoid arthritis. *Revista Brasileira de Engenharia Biomedica*, 30(1), 54–63. <https://doi.org/10.4322/rbeb.2014.004>
- Castilho, M. C. de M., Oliveira, C. A. de, Junior, E. de S. B., Girondo, A. L. G. de C., & Lima-Arsati, Y. B. de O. (2011). Relação entre estresse percebido e fatores salivares, em mulheres, sob condições basais de estresse. *Arquivos Em Odontologia*, 47(1), 25–30. [http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-09392011000100004](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-09392011000100004)
- Ceron JJ, Lamy E, Martinez-Subiela S, Lopez-Jornet P, Capela-Silva F, Eckersall PD, Tvarijonaviciute A. (2020). Use of saliva for diagnosis and monitoring the SARS-CoV-2: a general perspective. *J Clin Med*. 9(1491);1-9. doi:10.3390/jcm9051491
- Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & De Palo, E. F. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 383, Issues 1–2, pp. 30–40). Clin Chim Acta. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
- Chibebe, P. C., Terreri, M., Ricardo, L. H., & Pallos, D. (2012). A B S T R A C T. In *Revista de Ciências Médicas* (Vol. 17, Issue 3/6). <https://seer.sis.puc-campinas.edu.br/seer/index.php/cienciasmedicas/article/view/754>
- Chojnowska S, Baran T, Wilińska I, Sienicka P, Cabaj-Wiater I, & Knás M. (2018). Human saliva as a diagnostic material. *Adv Med Sci*. 63(1):185-191. Doi: 10.1016/j.advms.2017.11.002
- Claes, S. J. (2004). CRH, Stress, and Major Depression: A Psychobiological Interplay. *Vitamins and Hormones*, 69, 117–150. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(04\)69005-4](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(04)69005-4)

Cozma, S., Dima-Cozma, L. C., Ghiciuc, C. M., Pasquali, V., Saponaro, A., & Patacchioli, F. R. (2017). Salivary cortisol and  $\alpha$ -amylase: Subclinical indicators of stress as cardiometabolic risk. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 50(2), e5577. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20165577>

Dawes, C., Pedersen, A. M. L., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G. B., Vissink, A., Aframian, D., McGowan, R., Aliko, A., Narayana, N., Sia, Y. W., Joshi, R. K., Jensen, S. B., Kerr, A. R., & Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. In *Archives of Oral Biology* (Vol. 60, Issue 6, pp. 863–874). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>

Decourt, B., & Sabbagh, M. N. (2011). BACE1 as a potential biomarker for alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's Disease*, 24(2), 53–59. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-110017>

Decramer, S. P., Gonzalez De Peredo, A., Breuil, B., Mischak, H., Monsarrat, B., Bascands, J.-L., & Schanstra, J. P. (2008). Urine in Clinical Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 7(10), 1850–1862. <https://doi.org/10.1074/mcp.R800001-MCP200>

Denny, P., Hagen, F. K., Hardt, M., Liao, L., Yan, W., Arellanno, M., Bassilian, S., Bedi, G. S., Boonthung, P., Cociorva, D., Delahunty, C. M., Denny, I., Dunsmore, J., Faull, K. F., Gilligan, J., Gonzalez-Begne, M., Halgand, F., Hall, S. C., Han, X., ... Fisher, S. J. (2008). The proteomes of human parotid and submandibular/sublingual gland salivas collected as the ductal secretions. *Journal of Proteome Research*, 7(5), 1994–2006. <https://doi.org/10.1021/pr700764j>

Diagnosis and classification of diabetes mellitus. (2005). In *Diabetes Care* (Vol. 28, Issue SUPPL. 1, pp. s37–s42). American Diabetes Association. [https://doi.org/10.2337/diacare.28.suppl\\_1.S37](https://doi.org/10.2337/diacare.28.suppl_1.S37)

Dimas, L. F., & Puccioni-Sohler, M. (2008). Exame do líquido cefalorraquidiano: Influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 44(2), 97–106. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442008000200006>

- Farinha, F. I. (2015). *A saliva como meio de diagnóstico*. Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz.
- Farnaud, S. J. C., Kosti, O., Getting, S. J., & Renshaw, D. (2010). Saliva: Physiology and diagnostic potential in health and disease. In *TheScientificWorldJournal* (Vol. 10, pp. 434–456). ScientificWorldJournal. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.38>
- Foley, J. D., Sneed, J. D., Steinhubl, S. R., Kolasa, J., Ebersole, J. L., Lin, Y., Kryscio, R. J., McDevitt, J. T., Campbell, C. L., & Miller, C. S. (2012). Oral fluids that detect cardiovascular disease biomarkers. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 114(2), 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.03.003>
- Franzmann, E. J., Reategui, E. P., Carraway, K. L., Hamilton, K. L., Weed, D. T., & Goodwin, W. J. (2005). Salivary Soluble CD44: A Potential Molecular Marker for Head and Neck Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14(3), 735–739.
- García-Godoy, F., & Hicks, M. J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. In *Journal of the American Dental Association* (Vol. 139, Issue 5 SUPPL., pp. 25S-34S). American Dental Association. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2008.0352>
- Gonçalves, A. S. T. (2015). *A saliva como meio de diagnóstico* [Instituto Superior de ciências da saúde Egas Moniz]. <https://comum.rcaap.pt/handle/10400.26/11072>
- Grigoriev, I. V., Nikolaeva, L. V., & Artamonov, I. D. (2003). Protein content of human saliva in various psycho-emotional states. *Biochemistry (Moscow)*, 68(4), 405–406. <https://doi.org/10.1023/A:1023695729019>
- Han P, & Ivanovski S. (2019). Effect of saliva collection methods on the detection of periodontium-related genetic and epigenetic biomarkers - a pilot study. *Int J Mol Sci*. 20(4729):1-16. doi:10.3390/ijms20194729
- Heim, C., Ehlert, U., & Hellhammer, D. H. (2000). The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. *Psychoneuroendocrinology*, 25(1), 1–35. [https://doi.org/10.1016/S0306-4530\(99\)00035-9](https://doi.org/10.1016/S0306-4530(99)00035-9)

Hellhammer, D. H., Wüst, S., & Kudielka, B. M. (2009). Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*, 34(2), 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.10.026>

Hu, S., Arellano, M., Boonthung, P., Wang, J., Zhou, H., Jiang, J., Elashoff, D., Wei, R., Loo, J. A., & Wong, D. T. (2008). Salivary proteomics for oral cancer biomarker discovery. *Clinical Cancer Research*, 14(19), 6246–6252. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5037>

Hu, S., Wang, J., Meijer, J., Jeong, S., Xie, Y., Yu, T., Zhou, H., Henry, S., Vissink, A., Pijpe, J., Kallenberg, C., Elashoff, D., Loo, J. A., & Wong, D. T. (2007). Salivary proteomic and genomic biomarkers for primary Sjögren's syndrome. *Arthritis and Rheumatism*, 56(11), 3588–3600. <https://doi.org/10.1002/art.22954>

Huijbers, A., Velstra, B., Dekker, T. J. A., Mesker, W. E., van der Burgt, Y. E. M., Mertens, B. J., Deelder, A. M., & Tollenaar, R. A. E. M. (2010). Open access proteomic serum biomarkers and their potential application in cancer screening programs. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4175–4193. <https://doi.org/10.3390/ijms11114175>

Jankowska, A. K., Waszkiel, D., & Kowalczyk, A. (2007). Saliva as a main component of oral cavity ecosystem. Part I. Secretion and function. In *Wiadomości lekarskie (Warsaw, Poland: 1960)* (Vol. 60, Issues 3–4, pp. 148–154). <https://europepmc.org/article/med/17726867>

Javaid, M. A., Ahmed, A. S., Durand, R., & Tran, S. D. (2016). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6(1), 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.08.006>

Kaczor-Urbanowicz, K. E., Martin Carreras-Presas, C., Aro, K., Tu, M., Garcia-Godoy, F., & Wong, D. T. W. (2017). Saliva diagnostics – Current views and directions. *Experimental Biology and Medicine*, 242(5), 459–472. <https://doi.org/10.1177/1535370216681550>

- Kaczor-Urbanowicz, K. E., & Wong, D. T. W. (2019). Proteomics. In *Translational Systems Medicine and Oral Disease*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813762-8.00004-9>
- Khaustova, S., Shkurnikov, M., Tonevitsky, E., Artyushenko, V., & Tonevitsky, A. (2010). Noninvasive biochemical monitoring of physiological stress by Fourier transform infrared saliva spectroscopy. *Analyst*, 135(12), 3183–3192. <https://doi.org/10.1039/c0an00529k>
- Lee, J., Garon, E., & Wong, D. T. (2009). Salivary diagnostics. *Orthodontics and Craniofacial Research*, 12(3), 206–211. <https://doi.org/10.1111/j.1601-6343.2009.01454.x>
- Lee, Y. H., & Wong, D. T. (2009). Saliva: An emerging biofluid for early detection of diseases. In *American Journal of Dentistry* (Vol. 22, Issue 4, pp. 241–248). NIH Public Access. [/pmc/articles/PMC2860957/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2860957/)
- Li, Y., St. John, M. A. R., Zhou, X., Kim, Y., Sinha, U., Jordan, R. C. K., Eisele, D., Abemayor, E., Elashoff, D., Park, N. H., & Wong, D. T. (2004). Salivary transcriptome diagnostics for oral cancer detection. *Clinical Cancer Research*, 10(24), 8442–8450. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1167>
- Lima, D. P., Sales, A., Correia, C., Lima, A., Anjos, D., & Boer, N. P. (2014a). O uso de saliva para diagnóstico de doenças orais e sistêmicas. *Revista Odontológica de Araçatuba*, 35(1), 55–59.
- Lima, D. P., Sales, A., Correia, C., Lima, A., Anjos, D., & Boer, N. P. (2014b). O uso de saliva para diagnóstico de doenças orais e sistêmicas. *Revista Odontológica de Araçatuba*, 1, 55–59.
- Lindqvist, D., Isaksson, A., Lil-Träskman-Bendz, & Brundin, L. (2008). Salivary cortisol and suicidal behavior-A follow-up study. *Psychoneuroendocrinology*, 33(8), 1061–1068. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2008.05.012>

Liu, J., & Duan, Y. (2012). Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. In *Oral Oncology* (Vol. 48, Issue 7, pp. 569–577). Oral Oncol. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.01.021>

Malamud, D. (2011). Saliva as a Diagnostic Fluid. In *Dental Clinics of North America* (Vol. 55, Issue 1, pp. 159–178). Dent Clin North Am. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.08.004>

Malathi, N., Mythili, S., & Vasanthi, H. R. (2014). Salivary Diagnostics: A Brief Review. *ISRN Dentistry*, 2014(158786), 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/158786>

Melo, M. R., Alvaro, J., Martins, R., Ismar, J., Barbosa, V., Romano, P., & Shcolnik, W. (2010). *Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular* Collection, transport and storage of samples for molecular diagnosis.

Mese, H., & Matsuo, R. (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. In *Journal of Oral Rehabilitation* (Vol. 34, Issue 10, pp. 711–723). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.2007.01794.x>

Miricescu, D., Greabu, M., Totan, A., & Didilescu, A. C. (2011). The antioxidant potential of saliva: clinical significance in oral diseases. *Therapeutics, Pharmacology and Clinical Toxicology*, 15(2), 139–143.

Nagler, R. M., HersHKovich, O., Lischinsky, S., Diamond, E., & Reznick, A. Z. (2002). Saliva analysis in the clinical setting: Revisiting an underused diagnostic tool. *Journal of Investigative Medicine*, 50(3), 214–225. <https://doi.org/10.2310/6650.2002.33436>

Novaković, N., Čakić, S., Todorović, T., Andjelski Raičević, B., Dožić, I., Petrović, V., Perunović, N., Špadijer Gostović, S., Kadović Sretenović, J., & Čolak, E. (2013). Antioxidative status of saliva before and after non-surgical periodontal treatment. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo*, 141(3–4), 163–168. <https://doi.org/10.2298/SARH1304163N>

- Nunes, L. A. S., & Macedo, D. V. De. (2013). Saliva as a diagnostic fluid in sports medicine: Potential and limitations. In *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* (Vol. 49, Issue 4, pp. 247–255). <https://doi.org/10.1590/S1676-24442013000400003>
- Omenn, G. S., States, D. J., Adamski, M., Blackwell, T. W., Menon, R., Hermjakob, H., Apweiler, R., Haab, B. B., Simpson, R. J., Eddes, J. S., Kapp, E. A., Moritz, R. L., Chan, D. W., Rai, A. J., Admon, A., Aebersold, R., Eng, J., Hancock, W. S., Hefta, S. A., ... Hanash, S. M. (2005). Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. In *Proteomics* (Vol. 5, Issue 13, pp. 3226–3245). Proteomics. <https://doi.org/10.1002/pmic.200500358>
- Orenes-Piñero, E., Cortón, M., González-Peramato, P., Algaba, F., Casal, I., Serrano, A., & Sánchez-Carbayo, M. (2007). Searching urinary tumor markers for bladder cancer using a two-dimensional differential gel electrophoresis (2D-DIGE) approach. *Journal of Proteome Research*, 6(11), 4440–4448. <https://doi.org/10.1021/pr070368w>
- Pariante, C. M. (2003). Depression, stress and the adrenal axis. *Journal of Neuroendocrinology*, 15(8), 811–812. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2826.2003.01058.x>
- Patel, S. A., & Barros, J. A. (2015). Introduction. In *Advances in Salivary Diagnostics* (pp. 1–16). Springer Berlin Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-662-45399-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-662-45399-5_1)
- Pejcic, M., Stojnev, S., & Stefanovic, V. (2010). Urinary Proteomics - a Tool for Biomarker Discovery. *Renal Failure*, 32(2), 259–268. <https://doi.org/10.3109/08860221003599759>
- Pereira de Lima, M., Dantas, R. V. F., Mendes, J. L., Neto, R. E. da C., Júnior, J. A. de L., & Souza, S. L. X. (2020). Biomarcadores salivares no diagnóstico e no monitoramento de patologias orais e sistêmicas. *Revista Cubana de Estomatologia*, 57(1), e2139. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072020000100013&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0034-75072020000100013&script=sci_abstract&tlng=pt)

Perez-Cornejo, P., Gokhale, A., Duran, C., Cui, Y., Xiao, Q., Hartzell, H. C., & Faundez, V. (2012). Anoctamin 1 (Tmem16A) Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel stoichiometrically interacts with an ezrin-radixin-moesin network. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(26), 10376–10381. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200174109>

Perez-Guaita, D., Ventura-Gayete, J., Pérez-Rambla, C., Sancho-Andreu, M., Garrigues, S., & de la Guardia, M. (2012). Protein determination in serum and whole blood by attenuated total reflectance infrared spectroscopy. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(3), 649–656. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6030-7>

Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clinical Chemistry*, 57(5), 675–687. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>

Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*, 4(2), 89–96. [www.ijbs.org](http://www.ijbs.org)

Pieper, R., Gatlin, C. L., McGrath, A. M., Makusky, A. J., Mondal, M., Seonarain, M., Field, E., Schatz, C. R., Estock, M. A., Ahmed, N., Anderson, N. G., & Steiner, S. (2004). Characterization of the human urinary proteome: A method for high-resolution display of urinary proteins on two-dimensional electrophoresis gels with a yield of nearly 1400 distinct protein spots. *Proteomics*, 4(4), 1159–1174. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300661>

Pisitkun, T., Johnstone, R., & Knepper, M. A. (2006). Discovery of urinary biomarkers. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5(10), 1760–1771. <https://doi.org/10.1074/mcp.R600004-MCP200>

Priya, Y., & Prathibha K, M. (2017). Methods of collection of saliva-A Review. *International Journal of Oral Health Dentistry*, 3(3), 149–153. <https://doi.org/10.18231/2395-499X.2017.0032>



- Rahim, M. A. A., Abdul Rahim, Z. H., Wan Ahmad, W. A., & Hashim, O. H. (2015). Can saliva proteins be used to predict the onset of acute myocardial infarction among high-risk patients? *International Journal of Medical Sciences*, 12(4), 329–335. <https://doi.org/10.7150/ijms.11280>
- Ramont, L., Thoannes, H., Volondat, A., Chastang, F., Millet, M. C., & Maquart, F. X. (2005). Effects of hemolysis and storage condition on neuron-specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid and serum: Implications in clinical practice. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 43(11), 1215–1217. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2005.210>
- Rapado-González, Ó., Majem, B., Muínelo-Romay, L., López-López, R., & Suarez-Cunqueiro, M. M. (2016). Cancer salivary biomarkers for tumours distant to the oral cavity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms17091531>
- Rathnayake, N., Gieselmann, D.-R., Heikkinen, A., Tervahartiala, T., & Sorsa, T. (2017). Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. *Diagnostics*, 7(1), 7. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010007>
- Rehak, N. N., Cecco, S. A., & Csako, G. (2000). Biochemical composition and electrolyte balance of “unstimulated” whole human saliva. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(4), 335–343. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2000.049>
- Roi, A., Rusu, L. C., Roi, C. I., Luca, R. E., Boia, S., & Munteanu, R. I. (2019). A New Approach for the Diagnosis of Systemic and Oral Diseases Based on Salivary Biomolecules. *Disease Markers*, 2019(4), 1–11. <https://doi.org/10.1155/2019/8761860>
- Rosa, N. R. N. (2011). *Do protemoa celula ao oraloma* [Universidade Católica Portuguesa]. <https://repositorio.ucp.pt/handle/10400.14/9019>
- Rosato, P. N., Gama, F. G. V., & Santana, A. E. (2006). Physical-chemical analysis of the cerebrospinal fluid of healthy dogs submitted to different storage periods and temperatures. *Ciencia Rural*, 36(6), 1806–1810. <https://doi.org/10.1590/s0103-84782006000600021>

Salazar, M. G., Jehmlich, N., Murr, A., Dhople, V. M., Holtfreter, B., Hammer, E., Völker, U., & Kocher, T. (2013). Identification of periodontitis associated changes in the proteome of whole human saliva by mass spectrometric analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(9), 825–832. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12130>

Samaranayake L. (2007). Saliva as a diagnostic fluid. *Int Dent J*. 57(5):295-9. doi: 10.1111/j.1875-595x.2007.tb00135.x. PMID: 17992912.

Schoonenboom, N. S., Mulder, C., Vanderstichele, H., Van Elk, E.-J., Kok, A., Van Kamp, G. J., Scheltens, P., & Blankenstein, M. A. (2005). Effects of Processing and Storage Conditions on Amyloid  $\beta$  (1–42) and Tau Concentrations in Cerebrospinal Fluid: Implications for Use in Clinical Practice. *Clinical Chemistry*, 51(1), 189–195. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2004.039735>

Seeley, R. R., Tate, P., & Stephens, T. D. (2011). *Anatomy and Physiology* (McGraw-Hill. (8th Ed.).

Segal, A., & Wong, D. T. (2008). Salivary diagnostics: Enhancing disease detection and making medicine better. *European Journal of Dental Education*, 12(1), 22–29. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0579.2007.00477.x>

Spielmann, N., & Wong, D. (2011). Saliva: Diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*, 17(4), 345–354. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x>

Streckfus, C., & Bigler, L. (2005). The use of soluble, salivary c-erbB-2 for the detection and post-operative follow-up of breast cancer in women: the results of a five-year translational research study. *Advances in Dental Research*, 18(1), 17–24. <https://doi.org/10.1177/154407370501800105>

Surinova, S., Schiess, R., Hüttenhain, R., Cerciello, F., Wollscheid, B., & Aebersold, R. (2011). On the development of plasma protein biomarkers. In *Journal of Proteome Research* (Vol. 10, Issue 1, pp. 5–16). J Proteome Res. <https://doi.org/10.1021/pr1008515>

To KKW, Yip CCY, Lai CYW, Wong CKH, Ho DTY, Pang PKP, Ng ACK, Leung KH, Poon RWS, Chan KH, Cheng VCC, Hung IFN, Yuen KY. (2018). Saliva as a diagnostic specimen for testing respiratory virus by a point-of-care molecular assay: a diagnostic validity study. *Clin Microbiol Infect.* 25(3):372-378. doi: 10.1016/j.cmi.2018.06.009.

To KKW, Tsang OT, Yip CC, Chan KW, Wu TC, Chan JMC, Leung WS, Chik TSH, Choi CHC, Kandamby DH, Lung DC, Tam AR, Poon RWS, Fung AYW, Hung IFN, Cheng VCC, Chan JFW, Yuen KY. (2020). Detecção consistente de 2019 Novel Coronavirus in Saliva. *Clinical infecter diseases.* 71(15):841-843, <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa149>

Walsh, G. M., Rogalski, J. C., Klockenbusch, C., & Kast, J. (2010). Mass spectrometry-based proteomics in biomedical research: Emerging technologies and future strategies. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 12. <https://doi.org/10.1017/S1462399410001614>

Westrin, Å., & Niméus, A. (2003). The dexamethasone suppression test and CSF-5-HIAA in relation to suicidality and depression in suicide attempters. *European Psychiatry*, 18(4), 166–171. [https://doi.org/10.1016/S0924-9338\(03\)00044-0](https://doi.org/10.1016/S0924-9338(03)00044-0)

Wolf, J. M., Nicholls, E., & Chen, E. (2008). Chronic stress, salivary cortisol, and  $\alpha$ -amylase in children with asthma and healthy children. *Biological Psychology*, 78(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2007.12.004>

Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., & Wong, D. T. W. (2013). Salivary biomarkers: Toward future clinical and diagnostic utilities. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 26, Issue 4, pp. 781–791). <https://doi.org/10.1128/CMR.00021-13>

Zhang, H., Qi, C., Li, L., Luo, F., & Xu, Y. (2013). Clinical significance of NUCB2 mRNA expression in prostate cancer. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 32(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-56>

Zhang, Y., Sun, J., Lin, C. C., Abemayor, E., Wang, M. B., & Wong, D. T. W. (2016a). The emerging landscape of salivary diagnostics. In *Periodontology 2000* (Vol. 70, Issue 1, pp. 38–52). Blackwell Munksgaard. <https://doi.org/10.1111/prd.12099>

Zhang, Y., Sun, J., Lin, C. C., Abemayor, E., Wang, M. B., & Wong, D. T. W. (2016b). The emerging landscape of salivary diagnostics. *Periodontology 2000*, 70(1), 38–52. <https://doi.org/10.1111/prd.12099>

Zheng, H., Li, R., Zhang, J., Zhou, S., Ma, Q., Zhou, Y., Chen, F., & Lin, J. (2014). Salivary biomarkers indicate obstructive sleep apnea patients with cardiovascular diseases. *Scientific Reports*, 4(7046), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep07046>

